

Charakterisierung der SUMO-bindenden Protease Wss1

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**vorgelegt von
Diplom-Biologe
Michael Sven Schwarz**

23. September 2010

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Ich habe weder anderweitig versucht, eine Dissertation einzureichen oder eine Doktorprüfung durchzuführen, noch habe ich diese Dissertation oder Teile derselben einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

München, den 23. September 2010

Promotionsgesuch eingereicht am: 23. September 2010

Tag der mündlichen Prüfung: 26. November 2010

Erster Gutachter: Prof. Stefan Jentsch

Zweiter Gutachter: Prof. Charles David

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen Juni 2004 und September 2010 unter der Anleitung von Prof. Stefan Jentsch am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

1. Einleitung	1
1.1 Das Ubiquitin/ Proteasom-System.....	1
1.1.1 Das Ubiquitin-Konjugationssystem.....	1
1.1.2 Die Dekonjugation von Ubiquitin.....	4
1.1.3 Der proteasomale Abbau von Proteinen.....	5
1.1.4 Die Ubiquitin-spezifische Segregase Cdc48	6
1.1.5 Die physiologische Rolle von Cdc48.....	8
1.2 Das SUMO-System.....	11
1.2.1 Die Konjugation von SUMO.....	11
1.2.2 Die Dekonjugation von SUMO.....	12
1.2.3 Funktionen der SUMOylierung.....	14
1.2.4 Der SUMO-abhängige Protein-Abbau	15
1.2.5 Der <i>high copy</i> SUMO-Suppressor Wss1	18
Grundlagen und Zielsetzung der Arbeit.....	20
2. Ergebnisse	21
2.1 Die Interaktion von Wss1 mit Komponenten der SUMO-Kaskade	21
2.1.1 Wss1 bindet nicht-kovalent an SUMO.....	21
2.1.1.1 Wss1 besitzt ein SUMO-interagierendes Motiv	21
2.1.1.2 Wss1 bindet <i>in vitro</i> an SUMO.....	22
2.1.1.3 Wss1 bindet <i>in vivo</i> an SUMO.....	23
2.1.2 Wss1 interagiert mit Komponenten der SUMO-Kaskade.....	24
2.2 Beschreibung der Protease-defizienten Wss1-Variante Wss1^{H115A}	24
2.2.1 Die Proteasedomäne ist essentiell für die Funktion von Wss1.....	24
2.2.2 Die Protease-defiziente Wss1-Variante bindet verstärkt an polySUMOylierte- und ubiquitylierte Proteine	26
2.2.3 Wss1 interagiert mit ubiquitylierten Proteinen und mit SUMO-spezifischen Ubiquitin-Ligasen.....	28
2.2.4 Identifizierung von Wss1 Interaktionspartnern/ Substraten.....	29
2.3 Wss1 interagiert mit der AAA-ATPase Cdc48	30
2.3.1 Physische Interaktion von Wss1 und Cdc48	30
2.3.2 Wss1 besitzt zwei Cdc48 Interaktionsdomänen.....	32
2.3.3 Genetische Interaktion von $\Delta wss1$ mit <i>cdc48-6</i> , <i>ufd1-2</i> , $\Delta shp1$, $\Delta ufd2$ sowie Genen die im proteasomalen Abbau involviert sind	35
2.4 Identifikation und Beschreibung von Top1 als mögliches Wss1-Substrat.....	38
2.4.1 <i>WSS1</i> interagiert genetisch mit <i>TDP1</i> und Mutanten des MRX-Komplexes	38
2.4.2 <i>Tdp1</i> interagiert mit SUMO, Cdc48 und <i>Shp1</i>	43
2.4.3 Genetische Analyse der $\Delta wss1 \Delta tdp1$ -Deletionsmutante	47
2.4.4 <i>WSS1</i> und <i>TDP1</i> interagieren genetisch mit dem deSUMOylierenden Enzym <i>ULP2</i> ...	51
2.4.5 $\Delta wss1$ führt zum schnelleren Abbau von Top1.....	54
2.4.6 Wss1 schneidet Top1 <i>in vitro</i>	57
2.5 Agiert Wss1 auf SUMOyliertes Rad52?	60
2.6 Ist Cdc48 am SUMO-abhängigen Protein-Abbau involviert?.....	66
2.7 Genetische Interaktion von WSS1 mit der SUMO-Kaskade	70

2.8 Mögliche Regulation von Wss1	71
2.8.1 Wss1 schneidet sich selbst.....	72
2.8.2 Regulatorische Funktion der Wss1 SUMOylierung?	74
2.8.2.1 Wss1 wird SUMOyliert.....	74
2.8.2.2 Wss1 scheint SUMO-abhängig über Slx5 abgebaut zu werden.....	75
3. Diskussion.....	78
3.1 Wss1 und Tdp1 als neue Kofaktoren von Cdc48	79
3.2 Die Substratspezifität von Wss1	81
3.2.1 Wss1 und Cdc48 als neue Komponenten des SUMO-abhängigen Protein-Abbaus	82
3.2.2 Identifikation von Wss1-Substraten	85
3.3 Die Rolle von Cdc48, Wss1 und Tdp1 bei der Reparatur von kovalent mit der DNA-verknüpftem Top1	87
3.3.1 Mögliche Funktionen von Cdc48 bei der Reparatur von Top1-DNA-Addukten	87
3.3.2 Agieren Wss1 und Tdp1 auf SUMOyliertes und ubiquityliertes Top1?.....	89
3.4 Die Regulation der Wss1-Aktivität.....	94
3.4.1 Wss1 reguliert sich selbst.....	94
3.4.2 Wird Wss1 über den Slx5-abhängigen Proteinabbau reguliert?.....	94
4. Material und Methoden	96
4.1 Materialien.....	96
4.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	96
4.1.2 Computeranalysen	96
4.1.3 Antikörper.....	97
4.1.4 Escherichia coli-Stämme.....	97
4.1.5 Medien und Anzucht von E.coli.....	98
4.1.6 Saccharomyces cerevisiae-Stämme.....	98
4.1.7 Saccharomyces cerevisiae-Vektoren.....	101
4.1.8 Verwendete Plasmide	102
4.1.9 Medien und Anzucht von Saccharomyces cerevisiae	105
4.2. Techniken mit Escherichia coli	107
4.2.1. Herstellung kompetenter Zellen.....	107
4.2.2. Transformation von Bakterienzellen.....	107
4.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA.....	108
4.2.4 Konzentrationsbestimmung von DNA	109
4.2.5 Expression rekombinanter Proteine.....	109
4.2.6 Reinigung rekombinanter Proteine.....	109
4.3. Techniken mit Saccharomyces cerevisiae	110
4.3.1 Allgemeine Methoden	110
4.3.2 Spezielle Methoden	113
4.4. Molekularbiologische Methoden	116
4.4.1 Agarosegel-Elektrophorese	116
4.4.2 Isolierung von DNA aus Agarosegelen	117
4.4.3 Fällern von DNA	117
4.4.4 PCR.....	118
4.4.3 Klonierung	120
4.5. Proteinbiochemische Methoden	121
4.5.1 Gel-Elektrophorese	121
4.5.2 Western Blot	122
4.5.3 Erstellen eines Proteinextraktes	123
4.5.4 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	124
4.5.4 Immunpräzipitation von Proteinen	125

4.5.6 Denaturierende Ni-NTA-Chromatographie von Hefeproteinen.....	125
4.5.7 Native Aufreinigung von SUMOylierten Proteinen.....	126
4.5.8 Tandem-Massenspektroskopie.....	126
4.5.9 Protease-Aktivitätsnachweis	128
4.5.10 <i>In vitro</i> Interaktion von rekombinanten Proteinen	128
4.6. Oligonukleotide.....	129
4.7. Abkürzungsverzeichnis.....	130
5. Literaturverzeichnis.....	134

Zusammenfassung

Die Ubiquitin-spezifische AAA-ATPase Cdc48 ist ein wichtiger Bestandteil zahlreicher physiologischer Prozesse, die über den zellulären Proteinabbau reguliert werden. So können Proteine, die mit Ubiquitin modifiziert sind, spezifisch von Cdc48 und seinen Kofaktoren erkannt und an das Proteasom, einer hochmolekularen Protease, weitergereicht werden. Dabei wird die genaue Funktion von Cdc48 über die Interaktion mit Kofaktoren vermittelt und reguliert. Kofaktoren von Cdc48 werden allgemein in Rekrutierungs- und Prozessierungsfaktoren für Substrate unterteilt.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte die putative Protease Wss1 und das DNA-Reparaturprotein Tdp1 als neue Kofaktoren von Cdc48 beschrieben werden. Beide Proteine binden kompetitiv an Cdc48, wobei die Interaktion mit Cdc48 essentiell für die Funktion von Wss1 ist. Für Wss1 konnte zudem gezeigt werden, dass es in der Tat Protease-Aktivität besitzt und Top1 *in vitro* schneiden kann. Interessanterweise agiert auch Tdp1 auf Top1. So wirkt Tdp1 hydrolytisch auf kovalente Top1-DNA-Addukte und schneidet Top1 von der DNA ab. Top1 relaxiert torsionale Spannungen in der DNA, wobei es durch DNA-Schäden verursacht, zur Stabilisierung kovalenter Top1-DNA-Addukte kommen kann. Diese Top1-DNA-Addukte können wiederum zu toxischen DNA-Doppelstrangbrüchen führen, indem sie mit der Replikationsmaschinerie kollidieren.

Einiges spricht dafür, dass auch Wss1 direkt an der Reparatur dieser Top1-DNA-Addukte beteiligt sein könnte. So besitzt eine $\Delta wss1 \Delta tdp1$ -Doppeldelation starke, TOP1-abhängige Wachstumsdefekte. Zudem weisen TDP1 und WSS1 genetische Interaktionen mit Komponenten der SUMO- und Ubiquitylierungs-Kaskade auf, die ebenso TOP1-abhängig sind. Auch physisch interagieren Wss1 und Tdp1 mit SUMO. Beide Proteine besitzen ein SUMO-interagierendes Motiv und binden *in vivo* an SUMOylierte Proteine. Nachdem Top1-DNA-Addukte SUMOyliert sind legen diese Ergebnisse nahe, dass Tdp1 und Wss1 auf SUMOyliertes Top1 wirken, das kovalent mit der DNA verbunden ist.

Wss1 scheint höchstwahrscheinlich generell proteolytisch auf SUMOylierte Proteine zu wirken. So interagiert Wss1 SUMO-abhängig mit dem DNA-Reparaturprotein Rad52 und schneidet scheinbar ausschließlich die SUMOylierte Form von Rad52. Auch für Wss1 konnte gezeigt werden, dass es SUMOyliert wird und sich *in vivo* und *in vitro* selbst schneidet.

Im Rahmen der Arbeit konnten somit zwei SUMO-bindende Proteine als neue Kofaktoren von Cdc48 beschrieben werden, die Cdc48 in Verbindung mit dem SUMO-abhängigen Protein-Abbau bzw. im speziellen mit der Reparatur von Top1-DNA-Addukten bringen. Wahrscheinlich wird SUMOyliertes Top1 dabei zunächst ubiquityliert bevor Wss1 und Tdp1 über Cdc48-vermittelt an dieses binden und aktiv werden können.

1. Einleitung

Posttranslationale Proteinmodifikationen sind eine der effektivsten Möglichkeiten um Proteinfunktionen zu verändern und daher essentiell für die Regulation und das Zusammenspiel von zahlreichen Proteinen in der Zelle. Dadurch ist die Zelle in der Lage, schnell und dynamisch auf sich ändernde Bedingungen zu reagieren. Neben der posttranslationalen Modifikation mit chemischen Gruppen, wie Methyl oder Acetyl können Proteine auch mit anderen Proteinen modifiziert werden. Die hierbei am besten verstandene Modifikation ist die kovalente Modifikation mit Ubiquitin. Die Ubiquitylierung von Proteinen spielt in vielen Aspekten der Zellphysiologie eine Rolle, wie z.B. bei der zellulären Proteinqualitätskontrolle sowie dem Abbau von kurzlebigen Proteinen. Dabei werden Proteine, die gezielt abgebaut werden sollen, durch spezifische Enzyme erkannt und ubiquityliert. Das mit Ubiquitin markierte Protein wird anschließend dem Proteasom, einer hochmolekularen Protease, zugeführt.

1.1 Das Ubiquitin/ Proteasom-System

Ubiquitin ist ein hoch konserviertes, lebensnotwendiges Protein von 76 Aminosäuren mit einer charakteristischen, kompakten Faltung und einem C-terminalen Doppelglycinmotiv (Pickart und Eddins, 2004). Diese sogenannte β -GRASP-Faltung, bestehend aus zwei alpha-Helices und fünf beta-Faltblättern, wird allgemein als Ubiquitin-Faltung charakterisiert. Die kovalente Modifikation mit dem Substrat erfolgt über den Carboxy-terminalen Glycinrest von Ubiquitin, mit dem es an die ϵ -Aminogruppe eines Lysinrests des Substrats verknüpft wird.

1.1.1 Das Ubiquitin-Konjugationssystem

Ubiquitin wird als Vorläuferprotein mit einer C-terminalen Verlängerung exprimiert. Ubiquitin muss daher zuerst von speziellen Ubiquitinproteasen so prozessiert

werden, dass das C-terminale Doppelglycinmotiv freigesetzt wird, bevor Ubiquitin über eine spezifische Ubiquitylierungskaskade mit dem Substrat verknüpft werden kann. Diese Kaskade besteht aus der Abfolge eines Ubiquitin-aktivierenden Enzyms (E1, in *S. cerevisiae* Uba1 genannt), eines konjugierenden Enzyms (E2, UbcS genannt), sowie einer Ubiquitin-Ligase (E3) (**Abb.1**). Die Aktivierung des Ubiquitins wird in der Bäckerhefe *S. cerevisiae*, wie auch in den meisten anderen Organismen, von einem einzigen lebensnotwendigen E1-Protein durchgeführt, das Ubiquitin in einem ATP-verbrauchenden Schritt zunächst adenyliert. Nach der Adenylierung von Ubiquitin erfolgt die Ausbildung eines energiereichen Thioesters zwischen dem C-terminalen Glycinrest des Ubiquitins und einem konservierten Cysteinrest im E1. Das so aktivierte Ubiquitin wird anschließend über eine Umesterungsreaktion, auf den Cysteinrest eines Ubiquitin-konjugierenden E2-Enzyms übertragen. In Hefe existieren für diesen Schritt elf verschiedene E2-Enzyme. Die Spezifität der Substrat-ubiquitylierung erfolgt letztlich primär durch das Vorhandensein zahlreicher E3-Ubiquitin-Ligasen, die neben der Affinität für Substrate auch die Fähigkeit besitzen spezifische E2s zu binden. Hierbei lassen sich zwei Klassen von E3-Ligasen unterscheiden. Während die eine Klasse das Substrat selbst ubiquityliert rekrutiert die andere das E2-Enzym zum Substrat, sodass das E2-Enzym das Substrat ubiquityliert.

Proteine der HECT-Familie gehören zur ersten Klasse. Sie binden zunächst das E2-Enzym und bilden in einer Umesterungsreaktion über einen internen Cysteinrest einen Thioester mit Ubiquitin aus. Anschließend transferieren diese Enzyme Ubiquitin auf das entsprechende Substrat. Die am häufigsten vorkommende Klasse der E3-Enzyme hingegen bringt das E2-Enzym in räumliche Nähe zum Substrat, wodurch das E2 Ubiquitin direkt mit dem Substrat verknüpfen kann. Zu diesen E3-Enzymen zählen Proteine mit einer sogenannten RING-Finger Domäne sowie die U-box Ligasen (Hibbert et al., 2009). Die Struktur der RING-Domäne und der U-Box ist relativ ähnlich. RING-Finger-Proteine kommen sowohl als einzelne Polypeptide, wie auch als hochmolekulare Proteinkomplexe vor. Einzelne E3s, wie Hrd1, besitzen neben dem RING-Finger auch eine Substraterkennungsdomäne. Hochmolekulare RING-Finger Komplexe, wie die Zellzyklusregulatoren APC (*Anaphase promoting complex*) oder SCF (*SKP1/ Cdc53/ E-Box protein*), weisen,

neben einem "Gerüstprotein" und der RING-Finger Untereinheit, verschiedene Untereinheiten für die Substraterkennung auf. Durch die Kombination mit unterschiedlichen Substraterkennungs-Untereinheiten wird somit die Möglichkeit der Erkennung von verschiedenen Substrate für den APC- bzw. SCF-Komplex erhöht.

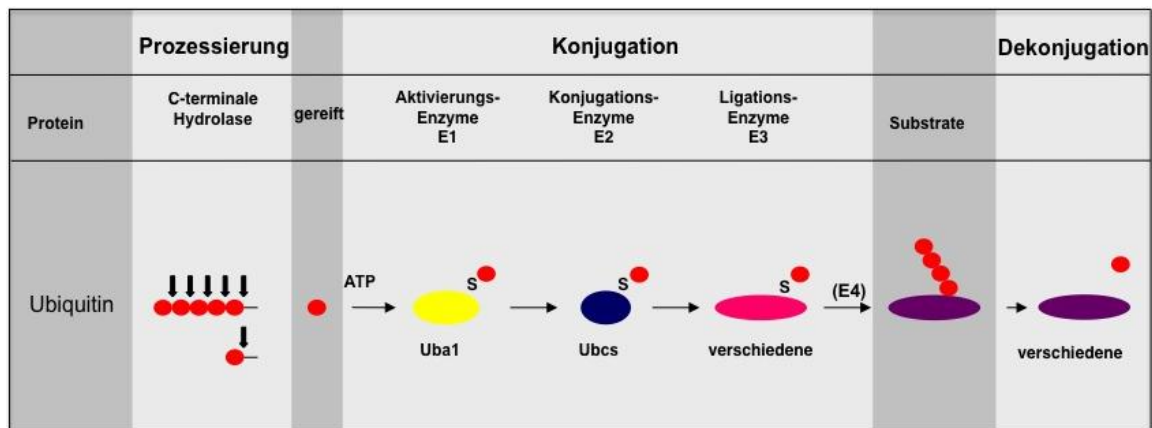


Abb. 1: Das Konjugations- und Dekonjugations-System von Ubiquitin.

Das Vorläuferprotein von Ubiquitin wird zunächst von speziellen Ubiquitinproteasen geschnitten und anschließend unter ATP-Verbrauch durch das E1-Enzym aktiviert. Die Verknüpfung mit dem Substrat erfolgt über das konjugierende E2 und das substratspezifität vermittelnde E3. Zur Kettenbildung wird in einigen Fällen auch noch ein E4-Enzym benötigt. Die Konjugation ist ein reversibler Prozess. Spezifische deubiquitylierende Enzyme (DUBs) können Ubiquitin wieder vom Substrat abschneiden.

Ubiquitinsubstrate können an einer einzigen Stelle (Monoubiquitylierung) oder auch an mehreren Stellen (Oligoubiquitylierung) mit Ubiquitin verknüpft werden. Ubiquitin-Substrate, die monoubiquityliert werden, scheinen dabei in ihrer Funktion moduliert zu werden. Dies spielt u.a. bei der Endozytose von Plasmarezeptoren (Hicke und Dunn, 2003) oder bei der DNA-Reparatur eine wichtige Rolle (Hoegel et al., 2002). Ubiquitin kann des Weiteren auch selbst, an einem seiner 7 internen Lysinreste, modifiziert werden, was zur Ausbildung einer Polyubiquitinkette führt (Xu et al., 2009). Je nach Art der Verknüpfung, d.h. des verwendeten Lysinrests in Ubiquitin, spricht man z.B. von K48- oder K63-Ketten. Dabei ist die Art der Verknüpfung entscheidend für die weitere Funktion des Substrats. Proteine die mit K48-Ketten modifiziert werden, werden von speziellen Rezeptoren des 26S-Proteasoms erkannt und anschließend degradiert (siehe Abschnitt 1.1.3). Auch die Proteinmodifikation mit K6-, K11- bzw. K29-verknüpften Polyubiquitinketten führt

zum Abbau des ubiquitylierten Substrats, wohingegen die Substrat-Verknüpfung mit K63-Polyubiquitinketten eher bei der DNA-Reparatur oder der NF- κ B Aktivierung eine Rolle spielen.

Neben der E3-vermittelten Polyubiquitylierung eines Proteins kann es zur Polyubiquitinkettenbildung auch der Hilfe sogenannter E4-Enzyme bedürfen (Koegl et al., 1999; Richly et al., 2005). Das am besten charakterisierte E4-Enzym (*S. cerevisiae* Ufd2) besitzt hierfür eine U-Box und ist an der Elongation der Polyubiquitinkette beteiligt.

In der Zelle existieren zahlreiche Ubiquitin-bindende Proteine, die in der Lage sind spezifische Ubiquitinkonjugate, wie Monoubiquitin oder Polyubiquitinketten zu erkennen und somit spezifisch an ubiquitylierte Proteine zu binden. Die Interaktion mit Ubiquitin erfolgt dabei über spezifische Interaktionsmotive, wie das UIM (*ubiquitin interacting motif*) oder über die UBA-Domäne (*ubiquitin-associated domains*). Zusätzlich interagieren Ubiquitin-bindende Proteine mit nachgeordneten Faktoren, wodurch die Ubiquitylierung des Substrats letztlich zu der gewünschten biologischen Funktion führt.

1.1.2 Die Dekonjugation von Ubiquitin

Die Ubiquitylierung eines Substrates ist ein reversibler Prozess. So besitzt das humane Genom ungefähr 79 Gene, die für Ubiquitin-spezifische Hydrolasen (deUbiquitylierungsenzyme, DUBs) kodieren (Nijman et al., 2005). Diese Proteine sind in der Lage Ubiquitin und Polyubiquitinketten von Substraten abzuscheiden (**Abb. 1**). Aufgrund ihrer aktiven Zentren lassen sich DUBs in Cystein- und Zink-Proteasen unterteilen. Dabei stellen die Cysteinproteasen die wesentlich größere Gruppe dar, zu denen die UCHs, USPs, OTUs und MJDs gehören. Zu den Zink-aktiven Proteasen zählen die JAMM-Proteine.

Deubiquitylierende Enzyme sind in verschiedensten Prozessen involviert. Eine wichtige Funktion der DUBs ist das "Recycling" von Ubiquitin. Darunter versteht man, dass sie die Menge an freiem Ubiquitin in der Zelle aufrecht erhalten, indem sie Ubiquitin von Proteinen abschneiden und Ubiquitin somit wieder für einen neuen

Ubiquitylierungszyklus zur Verfügung steht. DUBs, die diese Aufgabe durchführen, sind überwiegend mit dem Proteasom-assoziierte Proteine, wie z.B. die Metalloprotease Rpn11. Ihre Funktion ist es Ubiquitin, von Proteinen die proteasomal abgebaut werden, abzuschneiden. DUBs können aber auch der proteasomalen Degradation entgegenwirken, indem sie vor dem Proteasom wirken und die Polyubiquitinkette verkürzen bzw. ganz abschneiden und damit den Abbau des Substrates beeinträchtigen. So verhindert z.B. die Usp7-vermittelte Deubiquitylierung von p53 dessen Abbau (Sheng et al., 2006).

1.1.3 Der proteasomale Abbau von Proteinen

Das 26S-Proteasom ist eine zwei megaDalton große komplexe Struktur mit Proteaseaktivität, aufgebaut aus einem zentralen 20S-Zylinder und einer oder zwei 19S-Kappen (Groll et al., 1997; Walz et al., 1998) (**Abb. 2**). Die Nomenklatur der Untereinheiten bzw. des Proteasoms ergibt sich aus deren Sedimentationskoeffizienten. Die 20S-Untereinheit ist der proteolytische Teil des Proteasoms und besteht aus α - bzw. β -Untereinheiten, angeordnet in vier übereinander liegenden Ringen zu je sieben Proteinen ($\alpha\beta\beta\alpha$). Auf der Innenseite dieser tonnenähnlichen Struktur liegen in den β -Untereinheiten die jeweils drei aktiven Zentren. N-terminale Verlängerungen der α -Untereinheiten regulieren zusammen mit der 19S-Kappe den Eintritt des Substrats in den proteolytischen Teil des Proteasoms (Groll et al., 2000). Die 19S-Kappe des Proteasoms ist auch für die Substratrekrutierung zuständig. Dabei sind diese Substratrekrutierungsfaktoren entweder selbst Bestandteil des Proteasoms, wie die Untereinheit Rpn10, oder aber löslich in der Zelle, wie Rad23 oder Dsk2 (Deveraux et al., 1994; Young et al., 1998).

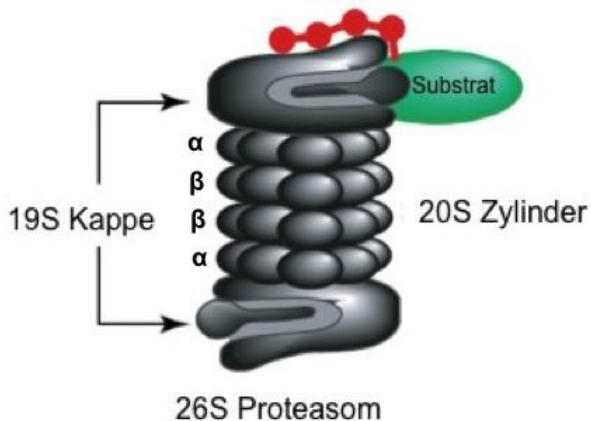


Abb. 2: Schematische Darstellung des 26S-Proteasoms.

Die Bindung des ubiquitylierten Proteins erfolgt über die 19S-Kappe des Proteasoms. Anschließend wird das Substrat in das proteolytisch aktive 20S-Proteasom weitergereicht. Dieses besteht aus vier übereinanderliegenden Ringen aus jeweils sieben α - bzw. β -Untereinheiten in der Reihenfolge $\alpha\beta\beta\alpha$ (nach Plemper und Wolf, 1999).

Neben der Art der Kettenverknüpfung scheint auch die Kettenlänge wichtig für den Abbau zu sein. So besitzen Rekrutierungsfaktoren von ubiquitylierten Proteinen an das Proteasom, wie z.B. Rad23, eine Präferenz für Proteine, bei denen die Kette aus mindestens vier Ubiquitinproteinen besteht. Rad23 kann dabei über eine sogenannte UBL-Domäne (*ubiquitin-like domain*) mit dem Proteasom und mittels einer sogenannten UBA-Domäne (*ubiquitin associated domain*) mit polyubiquitylierten Proteinen interagieren.

1.1.4 Die Ubiquitin-spezifische Segregase Cdc48

Viele ubiquitylierte Proteine können direkt vom Proteasom erkannt und degradiert werden. Schwieriger gestaltet sich die Situation, wenn zuerst einzelne Proteine aus Proteinkomplexen gezogen, oder mißgefaltete Proteine zunächst, z.B. aus dem Endoplasmatischen Retikulum, ins Zytoplasma überführt werden müssen, bevor diese dem Proteasom zugeführt werden können. Diese, dem Proteasom vorgeschalteten Schritte werden von der Chaperone-ähnlichen AAA-ATPase Cdc48 (in höheren Eukaryonten auch p97 oder VCP genannt) ausgeführt. AAA-ATPasen besitzen die Fähigkeit die Hydrolyse von ATP in mechanische Kraft umzusetzen, was wahrscheinlich zum Herauslösen von Proteinen, z.B. aus der ER-Membran, bzw. dem "Segregieren" von einzelnen Proteinen aus Komplexen genutzt werden kann. Auch die homohexamere AAA-ATPase Cdc48 kann als "Segregase" fungieren. Charakteristisch für AAA-ATPasen ist eine konservierte AAA-Typ

ATPase-Domäne, aufgebaut aus einem klassischen Walker A- und Walker B-Motiv, sowie einem stark konservierten SRH (*second region of homology*)-Motiv (**Abb. 3a und b**). Cdc48 besitzt zwei dieser AAA-Domänen (D1 und D2 genannt) sowie eine N-terminale Verlängerung (N-Domäne genannt), über die die Substrat- und Kofaktorbindung stattfindet. Kofaktoren von Cdc48, wie Ufd2 und Ufd3, können aber auch an den C-terminalen Bereich von Cdc48 binden.

Über die Aktivität der Kofaktoren werden wiederum die spezifischen Funktionen von Cdc48 reguliert. Dabei können Kofaktoren sowohl als Rekrutierungs- wie auch als Prozessierungsfaktoren für ubiquitylierte Proteine dienen. Rekrutierungsfaktoren, wie der Ufd1/Npl4-Komplex (Cdc48^{UFD1/Npl4}-Komplex), helfen in vielen proteolytischen Prozesswegen bei der Substraterkennung, wie z.B. in der ER-assoziierten Degradation (ERAD) von Proteinen (Braun et al., 2002; Rape et al., 2001). Prozessierungsfaktoren kommen wiederum wichtige Rollen für die weitere Funktion des Cdc48-Substrats zu. So wird durch die Bindung des WD40-Domänen-Proteins Ufd3, die kompetitiv zur Bindung des E4-Enzyms Ufd2 ist, die Polyubiquitylierung und der Abbau des Substrats verhindert (Rumpf und Jentsch, 2006). Auch die Bindung und Aktivität des deubiquitylierenden Enzyms Otu1 führt zur Stabilisierung von Cdc48 Substraten.

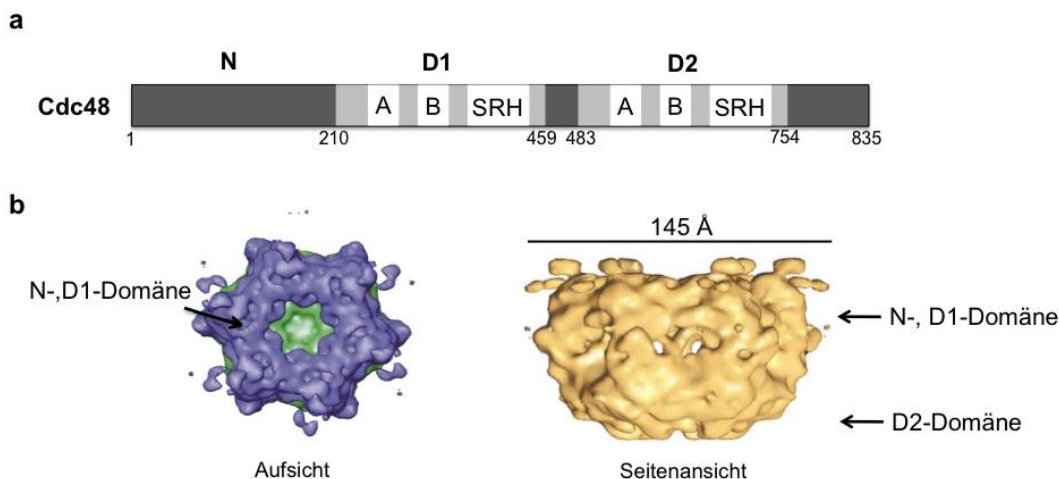


Abb 3: Die AAA-ATPase Cdc48.

a. Schematische Darstellung von *S. cerevisiae* Cdc48. Cdc48 besitzt zwei AAA-Domänen (D1, D2), die aus jeweils einem Walker A und B-, sowie dem SRH-Motiv aufgebaut sind. Die Zahlen geben die jeweiligen Aminosäurenreste an. **b.** Dreidimensionale Darstellung (EM-Struktur) des humanen Cdc48-homologen p97 (Zhang et al., 2000). Sicht von oben bzw. von der Seite. Dargestellt sind die N- und D1- bzw. die D2-Domäne des Proteins.

Die bisher größte bekannte Gruppe an Cdc48-Bindeproteinen stellen die sogenannten UBX- (*Ubiquitin-Regulatory-X-Domäne*) Proteine dar, die nach ihrer Cdc48-Interaktionsdomäne benannt sind (Buchberger et al., 2001). Für alle bisher charakterisierten UBX-Proteine konnte eine Interaktion mit Cdc48 nachgewiesen werden (Schuberth und Buchberger, 2008). Allerdings ist nur für einige UBX-Proteine eine Funktion beschrieben worden. So ist Ubx2 für die Rekrutierung von Cdc48 an die ER-Membran zuständig und erleichtert damit dessen Interaktion mit ERAD-Substraten. Dabei handelt es sich um Substrate, die zunächst mit Hilfe von Cdc48 aus dem ER ins Zytoplasma überführt werden müssen, damit sie dort proteasomal abgebaut werden können (Schuberth und Buchberger, 2005). Shp1 (Ubx1) wiederum scheint, über die Regulation der Phosphatase Glc7, eine Rolle in der Zellzyklusprogression zuzukommen (Cheng und Chen, 2010).

Ursprünglich wurde auch *CDC48*, wegen des Phänotyps einer temperatur-sensitiven *cdc48*-Mutante (*cell division cycle*-Mutante), mit der Zellzyklus-Progression in Verbindung gebracht (Frohlich et al., 1991; Moir et al., 1982). Darüber hinaus führen Mutationen in diesem lebensnotwendigen Gen zu einem verlangsamten Abbau von ubiquitylierten Proteinen, was u.a. zu Problemen im ER-assoziierten Proteinabbau sowie zu Sensitivitäten gegenüber DNA-schädigenden Drogen führt.

1.1.5 Die physiologische Rolle von Cdc48

Einige Kofaktoren von Cdc48 wurden ursprünglich als Faktoren isoliert, deren Gendelektionen zur Stabilisierung eines ansonsten extrem kurzlebigen Ubiquitin-Fusionproteins (Ubiquitin-Pro- β -Gal) beitragen. Bei diesem Konstrukt wurde ein nicht abspaltbares Ubiquitin als lineare Fusion an den N-Terminus von β -Galaktosidase fusioniert, sodass dieses über den sogenannten UFD-Weg (*Ubiquitin fusion degradation*) proteasomal abgebaut wird (Bachmair et al., 1986; Johnson et al., 1992). Auf der Suche nach Faktoren die im UFD-Weg, d.h. am Abbau dieses Ubiquitin-Fusionproteins (Ubiquitin-Pro- β -Gal) beteiligt sind, konnten mehrere Genmutanten (darunter *ufd1/npl4*, *ufd2* und *ufd3*) identifiziert werden, deren

Proteinprodukte zudem als Bindepartner von Cdc48 identifiziert wurden (Johnson et al., 1995; Rape et al., 2001; Rumpf und Jentsch, 2006). Dadurch wurde Cdc48 erstmals mit dem Abbau von ubiquitylierten Proteinen in Verbindung gebracht und beschrieben (Ghislain et al., 1996; Rape et al., 2001). Die genaue Funktion von Cdc48 im UFD-Weg ist bisher allerdings unverstanden.

Besser verstanden ist die Funktion von Cdc48 und bestimmten Kofaktoren im Zusammenhang mit der Aktivierung des in der ER-Membran verankerten Transkriptionsfaktors Spt23 (**Abb. 4**). Interessanterweise ist hierbei der C-terminale Bereich von Spt23 in der ER-Membran verankert. Um daher funktional aktiv werden zu können, muss Spt23 zunächst prozessiert, aus der Membran gelöst und in den Kern gebracht werden. Cdc48 ist dabei sowohl am Loslösen von Spt23 von der Membran involviert, d.h. an der Aktivierung des Transkriptionsfaktors, als auch an der Degradation und damit der Inaktivierung des prozessierten Fragments von Spt23.

Der Transkriptionsfaktor Spt23 spielt eine wichtige Rolle im sogenannten *OLE-pathway*. Dabei reguliert Spt23 die Transkription des *OLE1*-Gens, das für die $\Delta 9$ -Fettsäuredesaturase kodiert. So kommt es bei einem Mangel an ungesättigten Fettsäuren zur Aktivierung des ER-membranständigen Transkriptionsfaktors Spt23 und damit zur Aktivierung der *OLE1*-Expression. Spt23 liegt in der Regel als inaktives Homodimer vor. Zur Aktivierung von Spt23 wird ein Protein des Dimers durch die E3-Ligase Rsp5 ubiquityliert, was zum partiellen Verdau durch das Proteasom führt (Piwko und Jentsch, 2006). Dadurch entsteht ein trunkiertes, ubiquityliertes Spt23-Fragment (p90), das mit Hilfe des Cdc48^{UFD1/Npl4}-Komplexes von seinem unprozessierten Interaktionspartner (p120) getrennt wird (Braun et al., 2002; Rape et al., 2001). Cdc48 liefert hierbei höchstwahrscheinlich die motorische Kraft zur Mobilisierung des aktiven Transkriptionsfaktors durch Herauslösen ("Segregieren") des Proteins aus dem Dimer. Das Spt23-Fragment kann somit in den Zellkern gelangen und die Expression des *OLE1*-Gens anschalten.

Interessanterweise ist das aktive Spt23-Fragment (p90) kurzlebig und wird Cdc48-vermittelt degradiert. Dazu wird der Transkriptionsfaktor von Cdc48^{UFD1/Npl4} erkannt, von dem E4-Enzym Ufd2 polyubiquityliert und anschließend über die polyubiquitinbindenden Proteine Rad23 und Dsk2 dem Proteasom zugeführt. Diese

Weiterleitung eines Proteins über Cdc48 und seinen Kofaktoren zum Proteasom hin wird allgemein als der sogenannte *Escort pathway* beschrieben (Richly et al., 2005). Im *OLE1*-Prozessweg lassen sich somit alle Eigenschaften der AAA-ATPase Cdc48 beobachten. Die Rekrutierung, die Prozessierung und das Weiterreichen von ubiquitylierten Proteinen an das Proteasom.

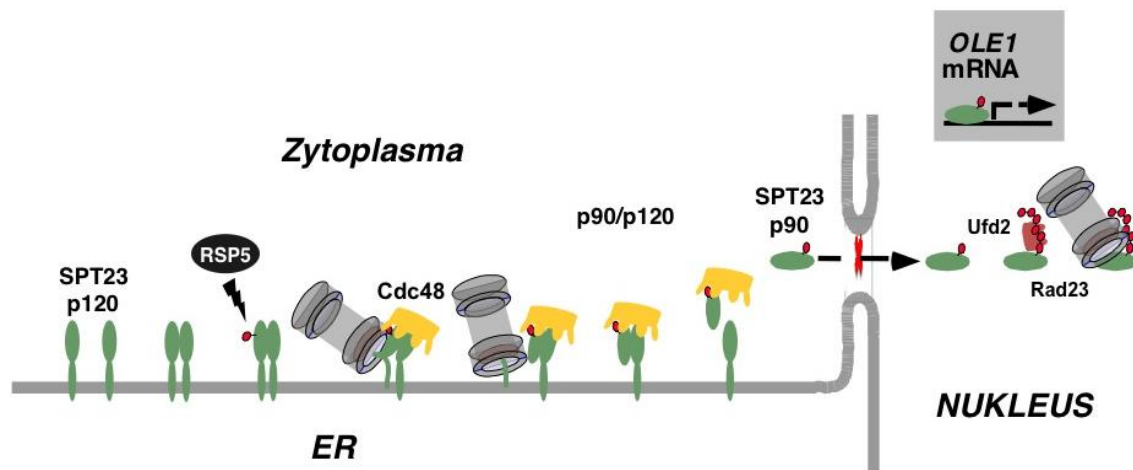


Abb 4: Die Aktivierung des *OLE1*-Gens.

Schematische Darstellung der Aktivierung des Spt23-Transkriptionsfaktors und des Abbaus des aktiven p90 Fragments. Erläuterungen siehe Text (Rape et al., 2001; Richly et al., 2005).

Ebenso gut verstanden ist die ERAD-Funktion von Cdc48. Das Besondere hierbei ist, dass membranständige bzw. lumenale ER-Proteine zuerst aus dem ER ins Zytoplasma transportiert werden müssen, um dort über den Ubiquitin/ Proteasom-Weg abgebaut werden zu können. Cdc48^{UFD1/Npl4} scheint dabei sowohl beim Loslösen von membranständigen ubiquitylierten Proteinen, wie auch beim Transport von lumenalen Proteinen durch die Membranpore eine Rolle zu spielen (Elkabetz et al., 2004; Jarosch et al., 2002; Ye et al., 2003). *cdc48*-Mutanten sind daher nicht in der Lage ERAD-Substrate dem Abbau zuzuführen. Stattdessen akkumulieren diese an der ER-Membran. Beim ER-assoziierten Proteinabbau wirken auch Rad23 und Dsk2 mit, sodass auch dieser Prozess höchstwahrscheinlich über den *Escort-pathway* verläuft (Richly et al., 2005).

1.2 Das SUMO-System

Neben der posttranslationalen Modifikation mit Ubiquitin können Proteine auch mit verschiedenen Ubiquitin-ähnlichen Modifikationsproteinen, den sogenannten UBLs (*ubiquitin-like proteins*) modifiziert werden. Diese besitzen, trotz nur geringer Sequenzidentität zu Ubiquitin, die für Ubiquitin charakteristische β -GRASP Faltung. Das bisher am besten verstandene UBL ist SUMO (*s*mall *U*biquitin-related *m*odifier). SUMO besitzt analog zu Ubiquitin, neben der β -GRASP Faltung und dem für die Konjugation essentiellen Doppelglycinmotiv, auch eine zusätzliche N-terminale Extension, der eine Funktion bei der PolySUMO-Ketten Bildung zukommt. Unter PolySUMO-Ketten versteht man die Verknüpfung von SUMO mit einem der N-terminalen Lysinreste (K11, K15, K19) eines anderen SUMO-Proteins. Diese Verknüpfung führt letztendlich zur PolySUMOylierung eines Substrats. In Vertebraten existieren vier homologe Gene für SUMO (SUMO-1, SUMO-2, SUMO-3 und SUMO-4) (Wilkinson und Henley, 2010)(Wilkinson und Henley)(Wilkinson und Henley) . Allerdings scheinen nur die SUMO-Varianten SUMO-1, SUMO-2 und SUMO-3 exprimiert zu werden, da bisher noch kein endogenes SUMO-4 nachgewiesen werden konnte. Die SUMO-Varianten sind untereinander sehr ähnlich. So besitzt SUMO-1 innerhalb einer Spezies zu SUMO-2 und SUMO-3 ungefähr 50% Sequenzidentität, während letztere von der Sequenz zu ca. 87% identisch sind. SUMO-2 und SUMO-3 sind zudem in der Lage PolySUMO-Ketten auszubilden, wohingegen bisher keine PolySUMO-1-Ketten gefunden werden konnten. In Hefe existiert nur ein Gen für SUMO/ SMT3. Das Gen für SUMO in *S. cerevisiae* ist im Gegensatz zum *S. pombe* SUMO-Gen (*PMT3*) lebensnotwendig.

1.2.1 Die Konjugation von SUMO

Auch SUMO wird ähnlich wie Ubiquitin zunächst als Vorläuferprotein exprimiert. Durch die Aktivität einer SUMO-spezifischen Hydrolase, Ulp1 in Hefe, kommt es zur proteolytischen Prozessierung des C-terminalen Bereichs des SUMO-Vorläuferproteins und damit zur Freisetzung des Doppelglycin Motivs. Die

Verknüpfung mit dem Substrat erfolgt anschließend über eine SUMO-spezifische Kaskade aufgebaut aus einem SUMO-aktivierenden Enzym (E1), einem konjugierendem Enzym (E2) und einem SUMO-ligierendem Enzym (E3s) (**Abb. 5**), die SUMO analog zu Ubiquitin zuerst aktivieren und anschließend verknüpfen (Hay, 2005). In *S. cerevisiae* wird die SUMO-Aktivierung von einem E1-Heterodimer (Aos1/Uba2) und die SUMO-Konjugation vom E2-Enzym Ubc9 durchgeführt. Sowohl *AOS1/UBA2* als auch *UBC9* sind lebensnotwendige Gene und spielen in der Zellzyklus-Progression eine Rolle. So arretieren temperatursensitive *AOS1*-, *UBA2*- und *UBC9*-Mutanten in der G2/M-Phase.

Die Konjugation von SUMO mit dem Zielsubstrat kann entweder direkt über Ubc9 oder über spezifische SUMO-Ligasen-vermittelt erfolgen. Trotz der großen Zahl an SUMOylierten Proteinen sind bisher nur wenige SUMO-Ligasen beschrieben worden. In *S. cerevisiae* existieren vier SUMO-E3s (Siz1, Siz2, Mms21 und das Meiose-spezifische Zip3), wobei die meisten Proteine über Siz1 und Siz2 (die Homologen der humanen E3s, der sogenannten PIAS-Familie) SUMOyliert werden. Diese sind auch für die PolySUMO-Kettenbildung zuständig. SUMO-Substrate werden *in vivo* hauptsächlich in einer bestimmten Sequenz (ψ KxE), der sogenannten SUMOylierungs-Konsensus Stelle, SUMOyliert. Hierbei steht ψ für eine hydrophobe und x für eine beliebige Aminosäure. Allerdings kann die SUMOylierung bei einigen Proteinen auch an Nicht-Konsensus Stellen stattfinden (Hoege et al., 2002).

1.2.2 Die Dekonjugation von SUMO

Die Regulation von SUMOylierten Proteinen findet in der Zelle größtenteils über SUMO-spezifische Hydrolasen (ULPs genannt) statt. In *S. cerevisiae* existieren zwei Ulp, Ulp1 und Ulp2, die gezielt das Doppelglycinmotiv von SUMO erkennen und hinter dem Motiv schneiden können. Für eine unterschiedliche Substratspezifität der zwei SUMO-Hydrolasen spricht, dass Gendeletionen dieser zwei Cysteinproteasen unterschiedliche zelluläre SUMOylierungsmuster aufweisen. Unter SUMOylierungsmuster versteht man hierbei die Gesamtheit der einzelnen Banden von SUMOylierten Proteinen im SUMO-spezifischen Western Blot. Die unterschiedliche

Substratspezifität wird auch durch die Lokalisierung der Ulp1 offensichtlich. Ulp1 lokalisiert überwiegend an die Kernpore und agiert auf mono- bzw. multi-SUMOylierte Proteine, mit einem SUMO- respektive mit mehreren singulären SUMO-Proteinen, modifizierte Proteine (Li und Hochstrasser, 2003) (Li und Hochstrasser, 2003)(Li und Hochstrasser, 2003). SUMO-Substrate werden auch polySUMOyliert, d.h. mit PolySUMO-Ketten modifiziert. Diese polySUMOylierten Proteine wiederum sind Substrate für die nukleäre Hydrolase Ulp2 (Kroetz et al., 2009; Li und Hochstrasser, 2000). So kommt es in $\Delta ulp2$ -Stämmen zur Akkumulierung von polySUMOylierten Proteinen, was zu einem temperatursensitiven (*ts*) Phänotyp führt. Dieser *ts*-Phänotyp kann durch Substitution der Lysinreste (K11, K15, K19), die für die SUMOketten-Bildung wichtig sind, supprimiert werden. In Vertebraten sind mehrere deSUMOylierende Enzyme (*SUMO-specific proteases*, SENPS) vorhanden, die sowohl bei der Prozessierung von SUMO, wie auch bei der Dekonjugation von SUMO eine Rolle spielen. Die größere Anzahl ist wahrscheinlich auf die unterschiedlichen SUMO-Varianten zurückzuführen, was sich auch in der Spezifität der SENPs für die jeweiligen SUMO-Proteine zeigt.

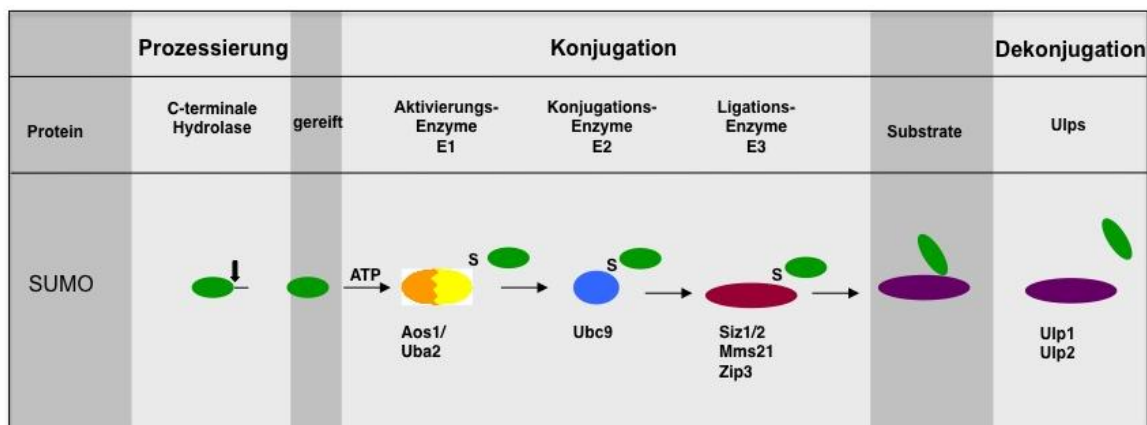


Abb. 5: Darstellung der SUMO-Kaskade.

Das Vorläuferprotein wird analog zu Ubiquitin prozessiert, bevor es durch das E1-Enzym aktiviert wird. Die energiereiche Bindung wird anschließend auf das E2 übertragen. Die Verknüpfung mit dem Substrat erfolgt entweder direkt über das E2-, oder von einem E3-Enzym vermittelt. Spezifische deSUMOylierende Enzyme (Ulp1) können SUMO vom Substrat wieder abschneiden.

1.2.3 Funktionen der SUMOylierung

Durch proteomische Studien in verschiedenen Organismen konnten mittlerweile zahlreiche SUMO-Substrate aus allen zellulären Bereichen identifiziert werden, darunter Transkriptionsfaktoren, DNA-Reparaturproteine und Zytoskelettproteine. Dabei kann die SUMO-Modifikation die Funktion der Substrate in vielfältiger Hinsicht modulieren und somit verschiedenste zelluläre Funktionen beeinflussen. So kann die SUMOylierung eines Substrates zu neuen Bindungsoberflächen führen, die wichtig für Protein-Protein-Interaktionen sind oder aber die Stabilität bzw. Lokalisierung des Substrats verändern.

Ein Beispiel für die Beeinflussung von Protein-Protein-Interaktionen ist die SUMOylierung von PCNA, dem Prozessivitätsfaktor für replikative Polymerasen. So führt die SUMOylierung von PCNA am Lysinrest K127 während der S-Phase zur Rekrutierung der Helikase Srs2 (Pfander et al., 2005). Die SUMOylierung an einer anderen Stelle von PCNA (K164) wiederum inhibiert die Bindung von Eco1 (Moldovan et al., 2006). Auch Protein-Protein-Interaktionen von einigen Transkriptionsfaktoren wird durch SUMOylierung beeinflusst. So kann deren SUMOylierung zur Gen-Repression von bestimmten Genen führen, höchstwahrscheinlich durch Rekrutierung von inhibitorischen Faktoren wie Histon-Deacetylasen (Girdwood et al., 2003). Andererseits kann die Substrat-SUMOylierung aber auch die Konformation und damit die Aktivität des Substrates verändern, wie bei dem humanen DNA-Reparaturprotein Thymin-DNA Glykosylase (Tdg). So führt die SUMOylierung von DNA-gebundenem Tdg zu einer Konformationsänderung in Tdg und der Dissoziation von seinem hydrolysierten Produkt, der apurinischen Seite in der DNA. Interessanterweise wird über die SUMOylierung von Tdg auch dessen Lokalisierung reguliert (Mohan et al., 2007).

Viele Proteine, die mit SUMOylierten Proteine interagieren, binden direkt an SUMO mittels eines spezifischen SUMO-interagierenden Motivs (SIM). Dieses Motiv besteht aus drei bis vier aliphatischen Aminosäuren, mitunter flankiert von sauren Aminosäuren. Damit können SIM-tragende Protein an die β -Faltblattstruktur von SUMO binden (Hecker et al., 2006; Song et al., 2004). Dieses Motiv kann sowohl einzeln, als auch mehrmals in einem SUMO-bindenden Protein vorkommen. Einige

Proteine, die mehrere hintereinander angeordnete SIMs besitzen, interagieren dabei präferentiell mit polySUMOylierten Proteinen. So binden RNF4 und Slx5, zwei Ubiquitinligasen mit zwei bzw. vier SIMs, bevorzugt an mit PolySUMO-Ketten modifizierte Proteine.

1.2.4 Der SUMO-abhängige Protein-Abbau

In letzter Zeit konnten verschiedene Proteine identifiziert werden, deren Ubiquitin-abhängiger Abbau durch die vorherige Modifikation mit PolySUMO-Ketten stimuliert wird. Es ist anzunehmen, dass diese Substrate zunächst durch die MonoSUMOylierung aktiviert und über die anschließende PolySUMOylierung inaktiviert und abgebaut werden. Demnach könnte über die SUMOylierung des Substrates die Aktivität des Proteins genau reguliert werden.

Ubiquitinligasen, die beim SUMOylierungs-abhängigen Protein-Abbau eine Rolle spielen, besitzen neben der für Ubiquitin-E3s charakteristischen RING-Fingerdomäne, spezielle SIMs, wodurch sie SUMOylierte Substrate erkennen und binden können. Dieser Aufbau ist charakteristisch für diese Klasse an Ubiquitinligasen, den sogenannten STUBLs (*SUMO-targeted ubiquitin ligases*) (**Abb. 6**) (Perry et al., 2008; Prudden et al., 2007; Uzunova et al., 2007; Xie et al., 2010). Substituiert man den für die SUMOylierung benötigten Lysinrest des Substrats bzw. das SIM des Ubiquitin-E3s so verhindert man auch die anschließende Substrat-Ubiquitylierung. Dies wurde u.a. für die Ubiquitylierung des Proteins PML durch das humane STUBL RNF4 gezeigt (Lallemand-Breitenbach et al., 2008; Tatham et al., 2008).

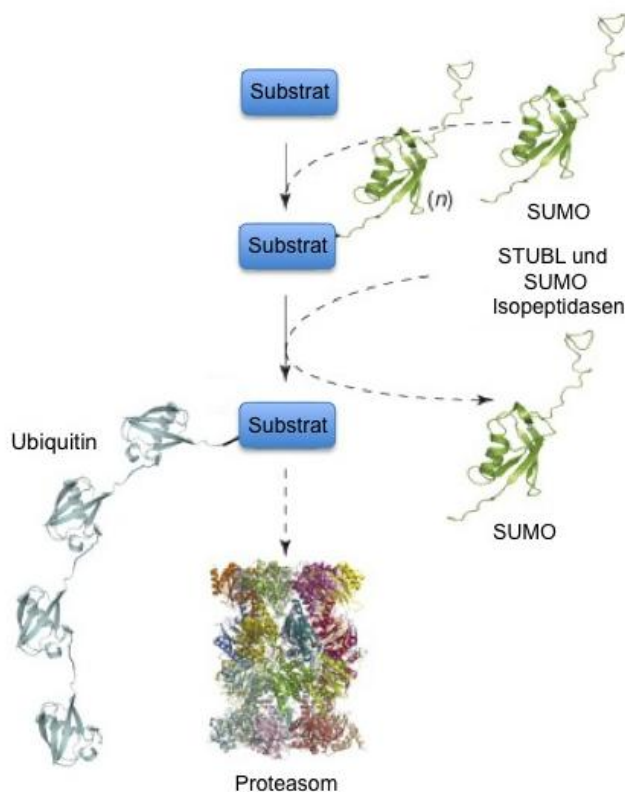


Abb. 6: Die STUBL-vermittelte Ubiquitylierung von SUMOylierten Proteinen.

Spezielle Ubiquitinligasen (STUBLs) können SUMOylierte Proteine über ihr SIM-vermittelt erkennen und die Substrate ubiquitylieren (abgeändert nach Perry et al, 2008). Dies führt zum Abbau der SUMOylierten Proteine über das Proteasom. SUMO-Isopeptidasen schneiden zuvor SUMO vom Substrat ab.

Das Tumor Suppressor Protein PML organisiert im Zellkern dynamische subnukleäre Strukturen, die sogenannten *PML-bodies*, denen u.a. eine Funktion in der Transkription und Apoptose zugeschrieben wird. Der Aufbau dieser *PML-bodies* ist abhängig von SUMO. So wird PML an drei Lysinen SUMOyliert und besitzt darüberhinaus auch ein SUMO-interagierendes Motiv. Damit kann ein PML-Protein weitere PML-Proteine binden und so einen verzweigten Komplex ausbilden. PML wird aber auch SUMOylierungs-abhängig degradiert. Unter speziellen Bedingungen, wie nach Zugabe von arsenischem Trioxid (As_2O_3), wird PML polySUMOyliert und anschließend abgebaut. Dazu bindet die Ubiquitin-Ligase RNF4 mit seinen zwei SIMs präferentiell an polySUMOyliertes PML und ubiquityliert dieses, was letztendlich zum proteasomalen Abbau von PML führt (Percherancier et al., 2009). Neben PML scheint auch SUMOyliertes Hif-2alpha RNF4-abhängig degradiert zu werden (van Hagen et al., 2010).

In *S. cerevisiae* existieren drei SUMO-abhängige Ubiquitin Ligasen (Ris1, Slx5, Slx8), wobei der RNF4-homologe Komplex Slx5/Slx8 das bisher am besten verstandene *S. cerevisiae* STUBL darstellt. Während das humane RNF4 aus einem

einzelnen Polypeptid besteht, sind die homologen STUBLS in Hefe aus einem heterodimeren Komplex aufgebaut. Das SUMOylierte Substrat wird hierbei von Slx5 (auch Hex3 genannt) erkannt und von Slx8 ubiquityliert. Zwar besitzen beide Proteine eine RING-Domäne, über die auch die Heterodimer-Bildung stattfindet, allerdings scheint nur Slx8 Ubiquitinligase Aktivität zu besitzen. Slx5 besitzt vier SIMs, was dazu führt, dass auch der Slx5/Slx8-Komplex präferentiell an mit PolySUMO-Ketten modifizierte Substrate bindet. In Hefe kommt es daher in Zellen, in denen die Gene für *SLX5* und *SLX8* deletiert sind, zur Akkumulierung von polySUMOylierten-Substraten. Diese akkumulieren ebenso, wenn man *ULP2*, das Gen für die Isopeptidase für PolySUMO-Ketten, deletiert oder durch MGA132 Zugabe das Proteasom inhibiert (Uzunova et al., 2007). Slx5/Slx8 scheint daher auf mit PolySUMO-Ketten-modifizierte Protein zu agieren die anschließend proteasomal abgebaut werden. Hinweise, dass die STUBLS auf mit PolySUMO-Ketten modifizierte Substrate agieren kommen auch aus Studien mit *S. pombe*. So kann eine Ulp2-Überexpression die Doppeldeletion der *S. pombe* Gene für die STUBLS *rfp1⁺ rfp2⁺* retten (Kosoy et al., 2007). Auch ein Verhindern der PolySUMO-Kettenformation durch die Deletion des Gens der SUMO-Ligase *pli1⁺* kann den Doppeldeletionsphänotyp supprimieren (Prudden et al., 2007).

Verschiedene SUMO-Substrate wurden bisher mit dem Slx5/Slx8-Komplex in Verbindung gebracht. So führen *SLX5*- und *SLX8*-Deletionen zu einem verlangsamten Abbau des Transkriptionsregulators Mot1 und zur Akkumulierung von dessen SUMOylierter Form (Wang und Prelich, 2009). Voraussetzung für den Abbau ist hierbei die vorhergehende SUMOylierung von Mot1. Auch für Rad52 konnte gezeigt werden, dass die SUMOylierte Form von Rad52 in $\Delta slx5$ bzw. $\Delta slx8$ -Stämmen akkumuliert. Interessanterweise wird Rad52 *in vitro* Slx5/Slx8-abhängig ubiquityliert, wobei dies durch eine artifizielle Fusion von Rad52 mit SUMO zusätzlich stimuliert werden konnte (Xie et al., 2007). Allerdings scheint die SUMOylierte Form von Rad52 *in vivo* stabil zu sein, weshalb unklar ist, ob Rad52 auch *in vivo* ein Ubiquitylierungs-Substrat für Slx5/Slx8 darstellt.

Das bisher am besten beschriebene Substrat von Slx5/Slx8 ist der Zelltyp-Regulator Mat α 2, dessen Abbau *in vivo* Slx5/Slx8-abhängig ist (Xie et al., 2010). Obwohl für die Ubiquitylierung von MAT α 2 die SIMs von Slx5 essentiell sind, ist die

SUMOylierung von MAT α 2 scheinbar nicht wichtig für die Degradation des Proteins, da beide Proteine direkt miteinander interagieren können. Die Autoren vermuten daher, dass eine interne SUMO-ähnliche Struktur von MAT α 2 für die SIM-abhängige Interaktion und den Abbau des Proteins verantwortlich ist. Dies zeigt, dass STUBLs, über das SIM vermittelt, *in vivo* nicht nur an SUMOylierte Proteine, sondern auch an SUMO-ähnliche Interaktionsmotive binden und auf diese wirken können.

1.2.5 Der *high copy* SUMO-Suppressor Wss1

Mehrere Proteine wurden in letzter Zeit mit SUMO in Verbindung gebracht. Darunter auch das Protein Wss1 (*weak suppressor of smt3-331*), welches, wenn überexprimiert die SUMO-Mutante *smt3-331* retten kann (Biggins et al., 2001). Zellen, die diese SUMO-Variante exprimieren, besitzen eine deutlich reduzierte Anzahl an SUMOylierten Proteinen und Defekte in der Chromosomensegregation, sowie in der Zellzyklusprogression. Die Überexpression des 269-Aminosäuren großen Wss1-Proteins führt dazu, dass der Wachstums-, nicht jedoch der Zellzyklusdefekt supprimiert wird. Die genaue Funktion von Wss1 und wie die Überexpression von Wss1 die SUMO-Mutante supprimieren kann ist allerdings unklar. Bekannt ist von Wss1 lediglich, dass eine WSS1-Deletion UV- und HU (*hydroxy urea*)-sensitiv und synthetisch letal mit einer Gendeletion der DNA-Helikase SGS1 ist (Birrell et al., 2001; O'Neill et al., 2004). Dies und die Interaktion mit Tof1, einer Untereinheit des Replikations-*checkpoints*, lassen vermuten, dass Wss1 eine Rolle beim Neustart oder der Prozessierung der Replikationsmaschinerie spielen könnte (Katou et al., 2003).

Bioinformatisch wurde Wss1 des Weiteren als putative Protease identifiziert, die ein sogenanntes WLM (*Wss1-like motif*) trägt (Iyer et al., 2004). Dieses Motiv findet sich ausschließlich in niederen Eukaryonten und weist die für Zink-bindende Metalloproteasen typische HEXSH-Sequenz auf, wobei "s" für eine "kleine" Aminosäure steht. Die Histidinreste dieser Sequenz koordinieren die Bindung an Metallionen, wodurch die Proteasen die Carboxylgruppe einer Peptidbindung angreifen können. Auf diese Art und Weise können Proteine geschnitten bzw.

komplett degradiert werden. Interessanterweise existieren in *S. pombe* zwei Homologe von Wss1 von denen eines eine Ubiquitin-ähnliche Domäne besitzt. Die Verbindung mit dem Ubiquitylierungsweg wird ferner dadurch unterstrichen, dass mittels bioinformatischer Analysen in Wss1 ein weiteres Motiv, die sogenannte SHP-Box identifiziert werden konnte (Hitt und Wolf, 2004). Dieses Motiv findet sich in mehreren Kofaktoren der AAA-ATPase Cdc48 und scheint eine Rolle bei der Interaktion mit Cdc48 zu spielen (Sato und Hampton, 2006). Allerdings konnte bisher keine Interaktion von Wss1 mit Cdc48 beschrieben werden.

Grundlagen und Zielsetzung der Arbeit

Wss1 wurde im Rahmen verschiedener Studien sowohl mit ubiquitylierten Proteinen, über ein putatives Cdc48-Interaktionsmotiv, als auch mit SUMO, über die Suppression der *smt3-331*-Mutante, in Verbindung gebracht. Wss1 könnte daher an beiden Prozesswegen beteiligt sein und demnach eine neue Schnittstelle zwischen diesen darstellen. Dabei ist die genetische Interaktion von Wss1 mit SUMO bisher allerdings genauso unklar, wie die Funktion der möglichen Cdc48-Interaktionsdomäne. Ziel dieser Arbeit war es beide Interaktionen genetisch und biochemisch genau zu charakterisieren und die Funktion von Wss1 aufzuklären. Dabei sollten mögliche Cdc48- bzw. SUMO-Interaktionsdomänen identifiziert, sowie untersucht werden wie wichtig diese Interaktionen für die Funktion von Wss1 sind. Wss1 wurde des Weiteren als putative Metalloprotease beschrieben. Zusätzlich sollte daher die Frage nach der Funktionalität der möglichen Proteasedomäne aufgeklärt und mit Hilfe verschiedener *Screens* bzw. Bindestudien mögliche Substrate dieser proteolytischen Funktion gefunden werden.

2. Ergebnisse

2.1 Die Interaktion von Wss1 mit Komponenten der SUMO-Kaskade

WSS1 wurde ursprünglich als *high-copy suppressor* der SUMO-Mutante *smt3-331* identifiziert. Diese SUMO-Mutante besitzt neben einem schweren Wachstums- und Zellzyklusdefekt auch Probleme bei der Chromosomensegregation und einen stark reduzierten Anteil an SUMOylierten Proteinen (Biggins et al., 2001). Durch Überexpression von Wss1 kann der Wachstums- nicht jedoch der Zellzyklusdefekt supprimiert werden. Auch ändert sich bei Überexpression von Wss1 der Anteil an SUMOylierten Proteinen in der Zelle nicht. Wie Wss1 demnach diese SUMO-Mutante retten kann ist unverstanden.

2.1.1 Wss1 bindet nicht-kovalent an SUMO

2.1.1.1 Wss1 besitzt ein SUMO-interagierendes Motiv

Bioinformatische Analysen ergaben jedoch eine direkte Verbindung zu SUMO. So besitzt Wss1 ein SUMO-interagierendes Motiv (SIM) (**Abb. 7**). Dazu wurden die SIMs des SUMO-bindenden Proteins Fir1 und des SUMO-aktivierenden Enzyms Uba2 mit dem SIM von Wss1 verglichen (Uzunova et al., 2007).

SUMO-interagierendes Motiv Typ a

Fir1	755	KMVE VILLDE EDVGLK
Uba2	579	GKDG IVILDD EGEIT
Wss1	273	SSLE VVILDDD EVLP GD

Abb. 7: Wss1 besitzt ein SIM.

Der Sequenzvergleich zeigt die bekannten SIMs von Fir1 und Uba2 und deren genaue Aminosäureposition. Wss1 weist die für ein SIM charakteristischen hydrophoben (in blau), sowie sauren Aminosäuren (in rot) auf.

Dabei wird ersichtlich, dass Wss1 im C-terminalen Bereich (Aminosäuren 273-276) eine hydrophobe Region von vier Aminosäuren (VIVL) besitzt, mit denen SUMO-bindende Proteine nicht-kovalent mit SUMO interagieren können. Des Weiteren besitzt Wss1 anschließend an den hydrophoben Bereich des SIMs vier saure Aminosäuren (DDDD). Dieser saure Bereich kann in SIMs sowohl N-terminal als auch C-terminal des hydrophoben Bereichs liegen. Zusätzlich gibt es auch SIMs, die nur den hydrophoben Bereich des SIMs aufweisen. Um im Rahmen der Doktorarbeit die einzelnen SIMs besser abgrenzen zu können wird nachfolgend zwischen SIMs des Typs a (bestehend aus hydrophoben und sauren Aminosäuren) und SIMs des Typs b (nur aus hydrophoben Aminosäuren bestehend) unterschieden. In höheren Eukaryonten scheinen die zusätzlichen sauren Aminosäuren eine wichtige Rolle in der SIM-Interaktion mit SUMO-1 und SUMO-2 zu spielen. So binden SIMs des Typs a bevorzugt an SUMO-1, während SIMs des Typs b eine Präferenz für SUMO-2 aufzuweisen scheinen (Hecker et al., 2006).

2.1.1.2 Wss1 bindet *in vitro* an SUMO

Die Identifikation eines SIMs in Wss1 warf die Frage auf, ob dieses funktional ist und Wss1 somit nicht-kovalent an SUMO binden kann. Aus diesem Grund wurde untersucht ob rekombinantes Wss1 mit aufgereinigtem SUMO *in vitro* direkt interagieren kann. Um dies zu testen wurde Wss1 aus *E.coli* aufgereinigt und in einem GST-*pull-down* Experiment mit rekombinanten SUMO-GST inkubiert. Das gebundene Wss1 wurde durch SDS-Gelelektrophorese und anschließender Coomassie-Färbung analysiert (**Abb. 8a**). Zur Kontrolle wurde Wss1 mit GST inkubiert und so nachgewiesen, dass Wss1 nicht mit dem GST-Protein interagiert. Die Interaktion mit SUMO-GST ist daher auf die spezifische Interaktion von Wss1 mit SUMO zurückzuführen. Mittels dieser *in vitro* Studie konnte somit gezeigt werden, dass Wss1 nicht-kovalent mit SUMO interagieren kann.

2.1.1.3 Wss1 bindet *in vivo* an SUMO

Um zu testen, ob Wss1 auch *in vivo* an SUMOylierte Proteine bindet, wurde in einem Hefe-Zwei Hybrid (Y2H)-Experiment die Interaktion einer trunkierten Variante von Wss1 (Wss1^{Δ1-163}) mit SUMO untersucht. Zusätzlich wurden die C-terminalen Glycinreste des SUMO-Y2H-Konstrukts mit Alaninresten substituiert, um sicherzugehen, dass SUMO nicht mit Wss1 verknüpft werden kann und es sich um eine nicht-kovalente Interaktion handelt. Es zeigte sich, dass Wss1 in der Tat auch *in vivo* mit SUMO interagieren kann (**Abb. 8b**). Diese Interaktion ist spezifisch, da Wss1 nicht mit der BD-Domäne (leer) interagieren kann. Im Y2H-Experiment wurde zudem analysiert, ob ausschließlich das SIM für die *in vivo* Bindung benötigt wird. Aus diesem Grund wurde die hydrophobe Region des SIMs deletiert (Wss1^{Δ1-163} SIM⁻). Dies führte dazu, dass Wss1 nicht mehr an SUMO binden konnte.

In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis steht auch die Interaktion von Wss1 mit SUMOylierten Proteinen in einem Immunpräzipitations (IP)-Experiment (siehe **Abb. 11**). Dazu wurde HA-Epitop markiertes Wss1 (Wss1^{HA}) mit anti-HA-Antikörpern aus Hefelysat präzipitiert und in einem anti-SUMO Western Blot nachgewiesen, dass SUMOylierte Proteine mit Wss1 ko-immunpräzipitieren.

Wss1 ist demnach ein SUMO-bindendes Protein, dass mit SUMO nicht-kovalent über ein sogenanntes SIM interagiert.

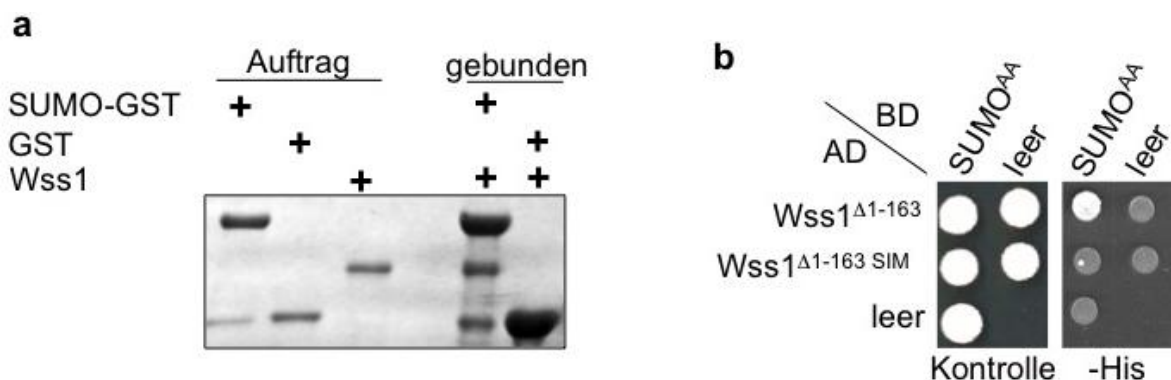


Abb. 8: Wss1 interagiert nicht-kovalent mit SUMO.

a. SUMO^{AA}-GST bzw. GST wurden mit rekombinantem Wss1 für 2 Stunden inkubiert und anschließend gewaschen. Gebundenes Wss1 wurde mit Coomassie-Färbung nachgewiesen. Der Input zeigt 10% der eingesetzten Mengen.

b. Hefe-Zwei Hybrid (Y2H)-Experiment mit Kombinationen von Fusionsproteinen bestehend aus der Gal4-Aktivierungsdomäne (AD) oder –Bindedomäne (BD) fusioniert an Wss1 bzw. SUMO. Wachstum auf dem jeweiligen Selektionsmedium (Sc-Leu-Trp-His) zeigt eine Interaktion der untersuchten Proteine an (Erläuterung siehe Material und Methoden).

2.1.2 Wss1 interagiert mit Komponenten der SUMO-Kaskade

SUMO wird über Enzyme der SUMO-Kaskade konjugiert. Viele Proteine die nicht-kovalent mit SUMO interagieren, binden auch an Komponenten der SUMO-Kaskade. Mittels eines Y2H-Ansatzes konnte gezeigt werden, dass dies auch für Wss1 zutrifft und Wss1 sowohl mit dem SUMO-E2 Ubc9, als auch mit der SUMO-Ligase Siz2, nicht jedoch mit der SUMO-Ligase Siz1 interagieren kann. Mit den deSUMOylierenden Enzymen Ulp1 bzw. Ulp2 konnte hingegen keine Wss1-Interaktion nachgewiesen werden (**Abb. 9a,b**).

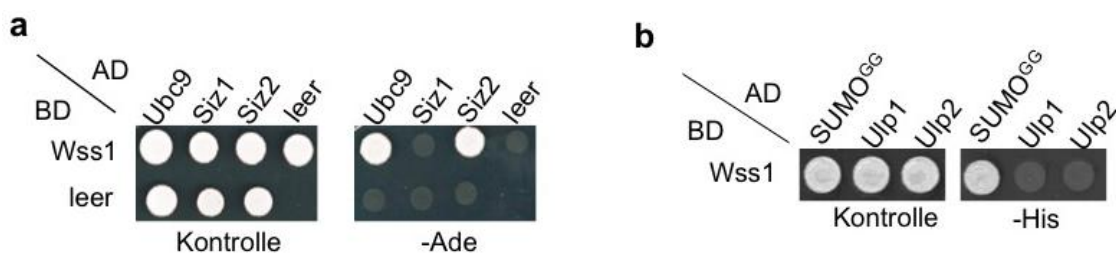


Abb. 9: Wss1 interagiert mit Komponenten der SUMO-Kaskade.

a. Nachweis der Interaktion von Wss1 mit Ubc9 und Siz2 im Hefe-Zwei Hybrid Experiment **b.** Wss1 kann im Y2H-Experiment nicht mit den deSUMOylierenden Proteasen Ulp1 und Ulp2 interagieren.

Beeinträchtigt man die SUMO-Bindung durch Deletion des SIMs von Wss1 so führt dies zum Verlust der Ubc9 Interaktion, unerwarteterweise jedoch nur zu einer verringerten Interaktion mit dem SUMO-E3 Siz2 (Daten nicht gezeigt).

Alles in allem zeigen die Ergebnisse, dass es sich bei Wss1 um ein neues SUMO-bindendes Protein handelt, das nicht-kovalent mit SUMO und bestimmten Komponenten der SUMO-Kaskade interagieren kann.

2.2 Beschreibung der Protease-defizienten Wss1-Variante Wss1^{H115A}

2.2.1 Die Proteasedomäne ist essentiell für die Funktion von Wss1

Wss1 besitzt neben seinem SIM ein weiteres Motiv, das sogenannte WLM (Wss1 like motif) (Iyer et al., 2004). Hierbei handelt es sich um eine putative Proteasedomäne, die typisch für Zink-bindende Metalloproteasen ist. Dabei wird das

Zink-Ion über zwei Histidinreste des Proteasemotivs HExsH (Aminosäure 115-119) gebunden.

Um herauszufinden, ob dieses Motiv funktionale Bedeutung für die Aktivität von Wss1 hat, wurde ein Histidinrest (Aminosäure 115) des Proteasemotivs durch einen Alaninrest substituiert ($wss1^{H115A}$). Interessanterweise führt diese Substitution im WLM zum kompletten Verlust der Suppression des *smt3-331*-Temperaturphänotyps durch Wss1-Überexpression (**Abb. 10**).

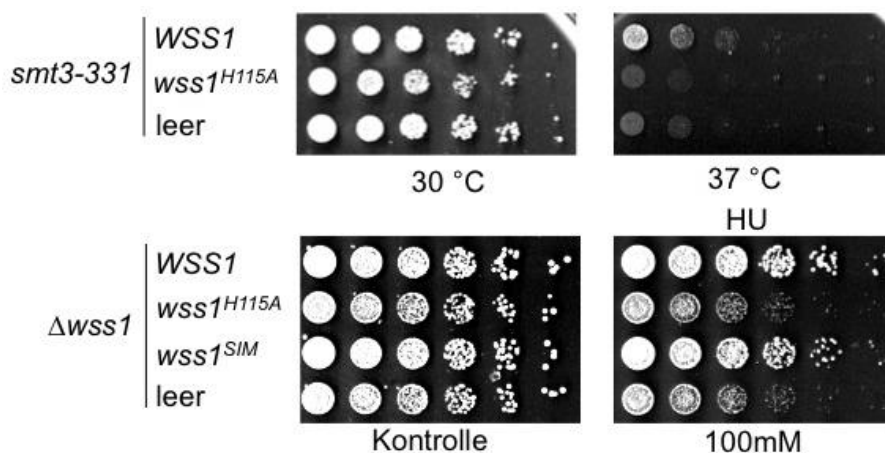


Abb. 10: Die Protease-defiziente Variante $wss1^{H115A}$ ist nicht in der Lage den *smt3-331*- bzw. $\Delta wss1$ -Phänotyp zu supprimieren.

Wss1 bzw. die Protease-defiziente Variante wurden im *sumo-331*- bzw. $\Delta wss1$ -Stamm überexprimiert bzw. unter eigenem Promotor exprimiert (im $\Delta wss1$ -Stamm). Serielle Verdünnungsreihen der Stämme wurden auf den entsprechenden Platten ausgebracht und für 3-5 Tage bei 30°C bzw. 37°C inkubiert.

Auch die HU-Sensitivität einer WSS1-Deletion konnte durch die Expression der Protease-defizienten (Pd) Variante ($wss1^{H115A}$), verglichen mit WT WSS1, nicht supprimiert werden. Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei Wss1 um eine aktive Protease handelt. Im Gegensatz dazu ist eine Wss1-Variante ($wss1^{SIM}$), in der der hydrophobe Teil des SIMs deletiert wurde, in diesem Testsystem funktional. Allerdings könnte die SIM-Variante, trotz Verlust der direkten SUMO Bindung, immer noch über die SUMO-Ligase Siz2 oder einen anderen Interaktor an SUMOylierte Proteine binden. Dies könnte erklären warum das SIM-Motiv *in vivo* scheinbar nicht essentiell für die Funktion von Wss1 ist.

2.2.2 Die Protease-defiziente Wss1-Variante bindet verstärkt an polySUMOylierte- und ubiquitylierte Proteine

Wss1 kann, wie bereits gezeigt, *in vivo* an SUMOylierte Proteine binden. Nachdem die Pd-Wss1-Variante den *smt3-331* Wachstums-Phänotyp nicht mehr retten kann stellte sich die Frage, ob Wss1 proteolytisch auf SUMOylierte Proteine wirkt und die Pd-Variante daher eine „Substrat Falle“ für SUMOylierte Proteine darstellen könnte. Unter „Substratfalle“ versteht man die Eigenschaft, dass die Pd-Variante das Substrat zwar binden, auf dieses aber nicht proteolytisch wirken kann. Dies führt zu einer Stabilisierung der Substrat-Protease Interaktion.

Mittels einer Immunpräzipitation von HA-markiertem Wss1 WT bzw. der Pd-Variante wurde die Interaktion mit SUMOylierten Proteinen untersucht.

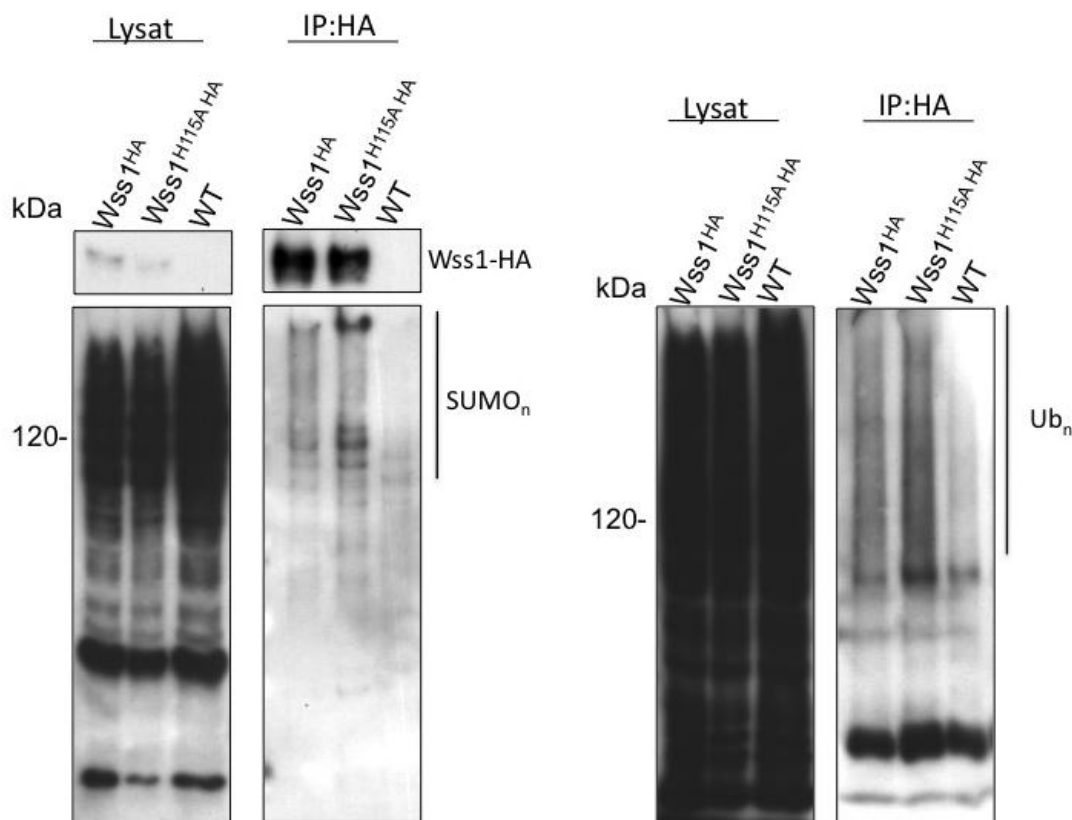


Abb. 11: Die Protease-defiziente Variante von Wss1 interagiert verstärkt mit SUMOylierten und ubiquitylierten Proteinen.

SUMOylierte Proteine wurden mit 3HA-markiertem Wss1 bzw. Wss1^{H115A} ko-immunpräzipitiert. Epitop markiertes Wss1, Wss1^{H115A} bzw. ein Leervektor (WT) als Vergleich wurde im $\Delta wss1$ -Hefestamm exprimiert und Wss1 durch anti-HA-Antikörper aus Hefelysaten präzipitiert. Gebundene SUMOylierte Proteine bzw. Wss1 wurden im Westernblot mit anti-SUMO- bzw. anti-HA-Antikörpern spezifisch nachgewiesen. Der Input zeigt 1% des eingesetzten Zelllysats. Nachweis der gebundenen ubiquitylierten Proteine mit anti-Ubiquitin-Antikörper.

Das Ergebnis zeigt, dass die Pd-Variante im Vergleich zu WT Wss1 verstärkt an polySUMOylierte-Proteine bindet (**Abb. 11**). Diese stellen in der Regel mit PolySUMO-Ketten modifizierte Substrate dar, die höchstwahrscheinlich von den SUMO-spezifischen Ubiquitinligasen Slx5/Slx8 bzw. Ris1 ubiquityliert und vom Proteasom abgebaut werden (Bylebyl et al., 2003; Uzunova et al., 2007). Interessanterweise konnten mit Wss1 im selben Versuch auch ubiquitylierte Proteine ko-immunpräzipitiert werden. Dies spricht dafür, dass auch Wss1 am Abbau von SUMOylierten und ubiquitylierten Proteinen beteiligt sein könnte.

PolySUMOylierte Proteine werden in *S. cerevisiae* von der Isopeptidase Ulp2 deSUMOyliert. Um zu bestätigen, dass Wss1 präferentiell mit polySUMOylierten Proteinen interagiert, wurde HA-Wss1 aus einem $\Delta ulp2$ -Stamm, in dem polySUMOylierte Proteine akkumulieren, immunpräzipitiert.

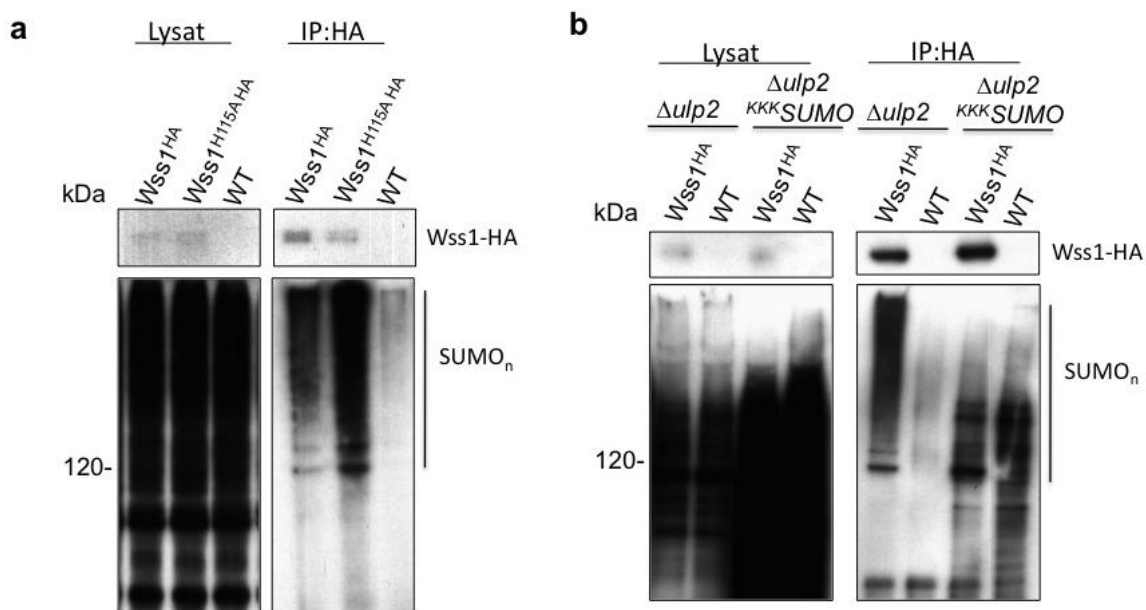


Abb. 12: Wss1 bindet spezifisch an polySUMOylierte Proteine.

a. HA-Epitop markiertes Wss1 bzw. Wss1^{H115A} wurde im $\Delta wss1 \Delta ulp2$ -Hefestamm exprimiert und mit anti-HA-Antikörpern präzipitiert. Gebundene polySUMOylierte Proteine wurden im Westernblot immunspezifisch nachgewiesen. **b.** Immunpräzipitation von HA-Epitop markiertem Wss1 aus $\Delta ulp2$ bzw. $\Delta ulp2$ KKK-SUMO. Wss1 wurde durch anti-HA-Antikörpern aus den angegebenen Hefelysaten gefällt und gebundene polySUMOylierte Proteine im Immunblot nachgewiesen.

Sowohl WT Wss1 als auch die Pd-Variante interagieren dabei verstärkt mit polySUMOylierten Proteinen (**Abb. 12a**). Auffällig ist jedoch wiederum die stärkere Bindung der Pd-Variante an SUMOylierte Substrate.

PolySUMO-Ketten entstehen, wenn SUMO an einem seiner N-terminalen Lysinreste (K11, K15, K19) mit einem oder mehreren SUMO-Proteinen verknüpft wird (Bylebyl et al., 2003). Eine Substitution dieser drei Lysinreste durch Argininreste führte im $\Delta ulp2$ -Stamm ($\Delta ulp2$ KKK-SUMO) zu einem Anstieg an SUMOylierten Proteinen um ungefähr das zehnfache (vergleiche $\Delta ulp2$ mit $\Delta ulp2$ KKK-SUMO). Trotz dieses Anstiegs konnten in diesem Stammhintergrund ($\Delta ulp2$ KKK-SUMO) mit Wss1 (Wss1^{HA}) kaum noch SUMOylierte Proteine ko-immunpräzipitiert werden (**Abb. 12b**). Es war lediglich die unspezifische Bindung von SUMOylierten Proteinen nachweisbar. Dies deutet darauf hin, dass Wss1 *in vivo* präferentiell an SUMO-Substrate bindet, die mit PolySUMO-Ketten modifiziert sind.

2.2.3 Wss1 interagiert mit ubiquitylierten Proteinen und mit SUMO-spezifischen Ubiquitin-Ligasen

In letzter Zeit wurden vermehrt Hinweise darauf gefunden, dass polySUMOylierte Proteine ubiquitylierungsabhängig über das Proteasom abgebaut werden (Iyer et al., 2004). Bisher wurden in *S. cerevisiae* drei Ubiquitin-Ligasen, die sog. STUBLS (Sumo-targeted ubiquitin ligases, Slx5, Slx8 und Ris1) beschrieben, die SIM-abhängig an SUMOylierte Proteine binden und diese ubiquitylieren. Dabei interagiert der Slx5/Slx8-Komplex bevorzugt mit Substraten, die mit PolySUMO-Ketten modifiziert sind (Xie et al., 2010). Da Wss1 sowohl an polySUMOylierte- wie auch an ubiquitylierte-Proteine bindet, wurde in einem Y2H-Experiment untersucht, ob Wss1 auch mit den SUMO-abhängigen Ubiquitinligasen interagiert.

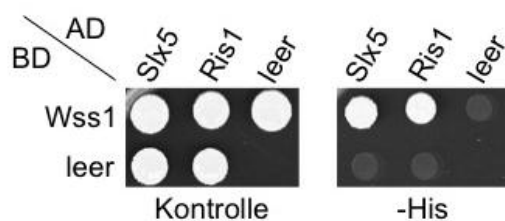


Abb. 13: Wss1 interagiert mit den STUBLS Slx5 und Ris1.

Hefe-Zwei Hybrid Experiment mit Wss1 und den STUBLS Slx5 und Ris1.

Interessanterweise kann Wss1 dabei sowohl mit Slx5 als auch mit Ris1 interagieren (**Abb. 13**). Mehrere Ergebnisse legen somit nahe, dass Wss1 direkt am SUMO-abhängigen Abbau von Proteinen beteiligt sein könnte

2.2.4 Identifizierung von Wss1 Interaktionspartnern/ Substraten

Ein grundlegender Aspekt, der in dieser Arbeit untersucht werden sollte, betrifft den Nachweis der proteolytischen Aktivität von Wss1 und die Suche nach Substraten. Um dies zu erreichen mussten verschiedene Probleme minimiert werden. So sind Enzym-Substrat Interaktionen üblicherweise sehr transienter Natur. Darüber hinaus führt die Aktivität der Protease zum Zerschneiden des Substrates möglicherweise sogar zu dessen kompletten Abbau. Um daher die Interaktion mit dem Substrat zu stabilisieren bzw. dessen Abbau zu verhindern, wurde neben WT Wss1 auch die PD-Variante Wss1^{H115A} für Interaktionsstudien verwendet. Wie bereits gezeigt, könnte diese Variante als mögliche Substratfalle für SUMOylierte Proteine dienen, indem sie die Interaktion mit diesen stabilisiert (siehe Abb.12).

Zur Identifikation von Substraten wurde MYC-markiertes Wss1 (^{MYC}Wss1) bzw. die Pd-Variante (^{MYC}Wss1^{H115A}) im $\Delta wss1 \Delta ulp2$ -Hintergrund überexprimiert und immunpräzipitiert. Dieser Stammhintergrund wurde gewählt, um deSUMOylierung zu verhindern und SUMOylierte Proteine zu stabilisieren. Die gebundenen Proteine wurden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt, mit Coomassie angefärbt und ausgeschnitten. Die ausgeschnittenen Banden wurden Trypsin-verdaut und die isolierten Peptide mittels Massenspektrometrie analysiert. Mehrere Peptide verschiedener Proteine konnten dabei spezifisch mit Wss1 ko-immunpräzipitiert werden (**Abb. 14**).

Wie erwartet konnten sowohl Peptide für SUMO, PolySUMO-Ketten (K15, K19 verknüpft) wie auch Polyubiquitinketten (K48 und K63 verknüpft) identifiziert werden. Interessanterweise wurde zudem die Ubiquitin-spezifische AAA-ATPase Cdc48 (modifiziert mit SUMO an Lysin K726 bzw. Ubiquitin an K70,72 und K241) gefunden. Diese fungiert als Segregase für ubiquitylierte Substrate und spielt bei der Ubiquitin-abhängigen Degradation von Proteinen eine Rolle. Auch der Cdc48-Kofaktor Shp1 konnte als Interaktor von Wss1 identifiziert werden. Allerdings konnten in der Wss1^{H115A}-, verglichen mit der WT-Wss1, -Immunpräzipitation keine unterschiedlichen Peptide gefunden werden. Dies legt nahe, dass eher funktionale Interaktionspartner als Wss1-Substrate isoliert wurden.

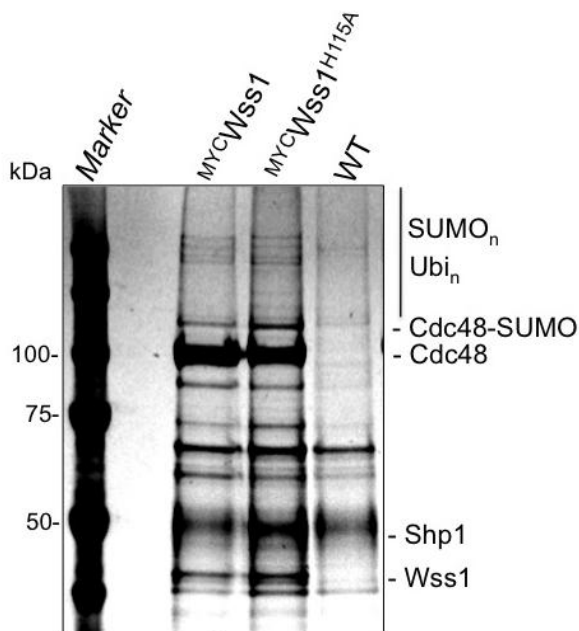


Abb. 14: Identifikation neuer Wss1 Interaktoren bzw. Substrate.

Myc-Epitop markiertes Wss1 bzw. Wss1^{H115A} wurde aus $\Delta wss1 \Delta ulp2$ -Hefelysaten mit anti-Myc-Antikörpern gefällt, gewaschen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Koimmunpräzipitierte Proteine wurden mit Coomassie angefärbt und mit MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert.

Zusätzlich wurde ein Y2H-screen mit WT-Wss1 bzw. Wss1^{H115A} durchgeführt. Hierbei konnte neben Cdc48 auch der Cdc48-Kofaktor Ufd1 sowie die bereits bekannten Interaktoren Ubc9 und Siz2 gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

Zusammengefasst lassen die Daten vermuten, dass es sich bei Wss1 um eine aktive Protease handelt. Dabei scheint sie an der Schnittstelle der zwei wichtigen Prozesswege SUMO- und Ubiquitylierung zu agieren. So bindet Wss1 sowohl an SUMO- als auch an ubiquitylierte Proteine, wobei die Pd-Variante die Interaktion mit SUMOylierten Proteinen sogar noch stabilisiert. Auch die Interaktion mit den Ubiquitinligasen Slx5 und Ris1 legt nahe, dass Wss1 auf SUMOylierte ubiquitylierte Proteine agiert.

2.3 Wss1 interagiert mit der AAA-ATPase Cdc48

2.3.1 Physische Interaktion von Wss1 und Cdc48

Um die Cdc48 Interaktion zu bestätigen, wurde Wss1 (Wss1^{HA}) mit anti-HA Antikörpern immunpräzipitiert und die Präsenz von Cdc48 mit einem Cdc48-spezifischen Antikörper bestätigt. Im selben Experiment konnte zudem die

Interaktion von Wss1 mit den Cdc48 Kofaktoren Ufd1 und Shp1 nachgewiesen werden (**Abb. 15**). Zusätzlich wurde auch das Bindeverhalten der Pd-Wss1 Variante (Wss1^{H115A HA}) untersucht. Diese verhielt sich wie WT Wss1 (Daten nicht gezeigt).

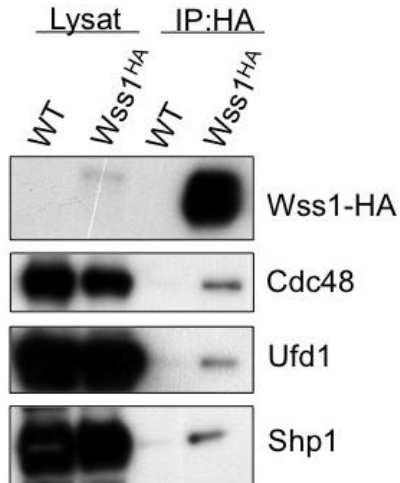


Abb. 15: Wss1 interagiert mit Cdc48, Ufd1 und Shp1.

Ko-IPs mit HA-markiertem Wss1. Wss1 wurde durch anti-HA-Antikörper aus Lysaten der entsprechenden Stämme präzipitiert und Cdc48, sowie seine Kofaktoren im Immunblot analysiert.

Die AAA-ATPase Cdc48 interagiert mit verschiedenen Kofaktoren, mit Hilfe derer Cdc48 auf zahlreiche Substrate wirken kann und somit an zahlreichen Prozessen in der Zelle beteiligt ist. Cdc48 könnte daher aus verschiedenen Gründen mit Wss1 interagieren:

So fungiert Cdc48 als Segregase für ubiquitylierte Proteine und führt diese über Kofaktoren-vermittelt, wie Ufd1 bzw. Shp1, dem Proteasom zu. Wss1 könnte somit ein Substrat für Cdc48 darstellen, welches Ubiquitin-abhängig abgebaut wird. Jedoch wurde keine Änderung der Proteinmenge von Wss1 in *cdc48-6* bzw. in *ufd1-2* oder Δ *shp1* festgestellt. Daher ist es unwahrscheinlich, dass Wss1 ein Substrat von Cdc48 ist (Daten nicht gezeigt). Ebenso vorstellbar wäre, dass Cdc48 ein Substrat für die putative Protease Wss1 sein könnte. Allerdings konnte keine Wss1-abhängige Prozessierung oder Degradierung von Cdc48 festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Wss1 könnte aber auch, ähnlich wie Ufd1 oder Shp1, ein Kofaktor von Cdc48 sein, der direkt mit Cdc48 interagiert.

Um die genaue Natur der Wss1-Cdc48 Interaktion zu bestimmen, wurde rekombinantes Wss1 in einem GST-*pulldown* Experiment mit Cdc48 präzipitiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und gebundenes Wss1 durch Coomassie Färbung nachgewiesen (**Abb. 16a**). Dabei konnte der Cdc48-Wss1 Komplex bestätigt werden.

Cdc48 ist ein ringförmig angeordnetes Hexamer, bestehend aus zwei ATPase-Domänen (D1D2) und einer N-terminalen Domäne, über die es mit Ubiquitin bzw. Rekrutierungsfaktoren für ubiquitylierte Proteine, wie den Kofaktoren Ufd1 und Shp1 interagieren kann (siehe Abb.3). Kofaktoren von Cdc48 können aber auch, wie Ufd2 oder Ufd3, an den C-terminalen Bereich binden. Interessanterweise bindet Wss1 *in vitro* vorwiegend an die N-Domäne von Cdc48 (**Abb. 16a**). Die schwache Interaktion mit der D1D2-Domäne von Cdc48 ist höchstwahrscheinlich unspezifisch, da Wss1 in einem Y2H-Experiment ausschließlich mit der N-Domäne von Cdc48 interagiert (**Abb. 16b**).

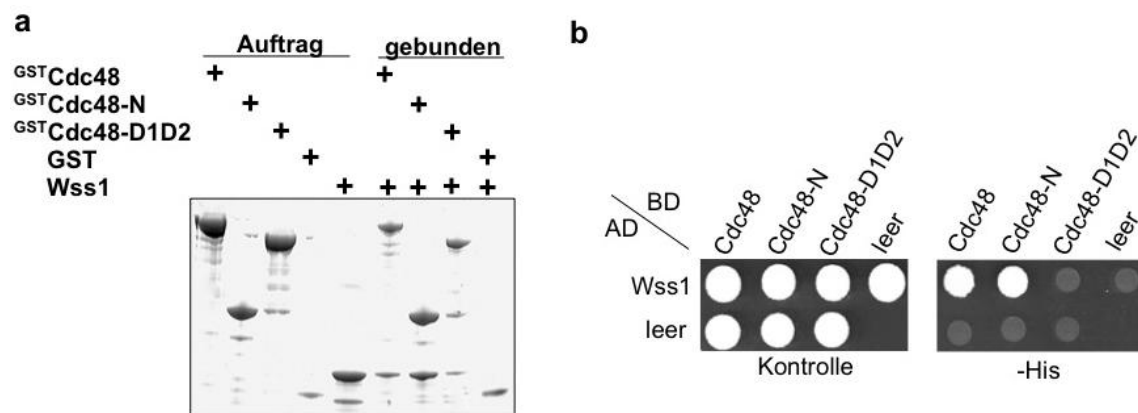


Abb. 16: Identifikation der Wss1-Interaktionsdomänen auf Cdc48.

a. GST-Cdc48 Volllänge sowie die N- bzw. D1D2-Domäne von Cdc48 wurden an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit rekombinantem Wss1 für 2 Stunden inkubiert. Nach stringenter Waschen und gelelektrophoretischer Auftrennung wurde gebundenes Wss1 durch Coomassie-Färbung analysiert. **b.** Charakterisierung der *in vivo*-Interaktion von Wss1 mit Cdc48 und dessen Domänen. Im Y2H-Experiment interagiert Wss1 spezifisch mit dem Vollängenkonstrukt und der N-Domäne von Cdc48.

Die *in vivo* und *in vitro* Interaktionsstudien zeigen, dass es sich bei Wss1 um ein neues Cdc48-Bindeprotein handelt, das direkt mit dem N-terminalen Bereich der AAA-ATPase interagieren kann.

2.3.2 Wss1 besitzt zwei Cdc48 Interaktionsdomänen

In Abschnitt 2.3.1 wurde eine direkte Interaktion von Wss1 mit Cdc48 nachgewiesen. Unterstrichen wird die Cdc48-Interaktion auch durch den bioinformatischen Nachweis, dass Wss1 eine sogenannte SHP-Box aufweist (Hitt und Wolf, 2004). Dieses Motiv besteht aus der konservierten Sequenz FxGxGQRn (Aminosäuren in

Wss1: 152-159), wobei „x“ für eine beliebige und „n“ für eine nicht-hydrophobe Aminosäure steht. Für das Protein Dfm1, welches bei der ER-Homeostase eine Rolle spielt, konnte bereits gezeigt werden, dass dieses Motiv für die *in vivo*-Interaktion mit Cdc48 notwendig ist. Zudem weisen auch die Kofaktoren Ufd1 und Shp1 ein solches Motiv auf, die wie Wss1 an die N-Domäne von Cdc48 binden (Sato und Hampton, 2006).

Um zu untersuchen, ob die SHP-Box für die Interaktion von Wss1 mit Cdc48 wichtig ist, wurden die fünf konservierten Aminosäuren des Motivs substituiert und getestet, ob diese SHP-Box-Variante (Wss1^{SHPBox}) noch an Cdc48 binden kann. In einem Ko-immunpräzipitations-Experiment mit HA-markiertem Wss1 konnte gezeigt werden, dass die SHP-Box unter endogenen Bedingungen scheinbar essentiell für die Cdc48 Bindung ist. So führt eine Substitution der fünf konservierten Aminosäuren zu einem Verlust der Wss1-Interaktion mit Cdc48 (**Abb. 17a**). Interessanterweise werden mit dieser Variante auch keine SUMOylierten Proteine mehr ko-immunpräzipitiert (Daten nicht gezeigt). Dies weist darauf hin, dass die SUMO-Interaktion hauptsächlich über Cdc48 vermittelt wird. Präzipitiert man hingegen Cdc48, in einem Stamm, der *WSS1* bzw. die SHP-Box-Variante von *WSS1* überexprimiert, so kann immer noch eine geringe Menge der SHP-Box-Variante (Wss1^{SHPBox}) mit Cdc48 zusammen aufgereinigt werden (**Abb. 17b**). Auch in einem Y2H-Experiment ist noch eine geringe Interaktion der beiden Proteine nachweisbar (**Abb. 17c**). Dies spricht für das Vorhandensein einer zweiten Cdc48-Bindestelle in Wss1.

Durch bioinformatische Vergleichsanalysen mit verschiedenen Cdc48-Bindeproteinen wurde dieses bestätigt (Kay Hofmann, persönliche Mitteilung). So besitzen mehrere Cdc48 Bindeproteine eine dem sogenannten VIM (*VCP-(Cdc48) interacting motif*)-ähnliche Sequenz (Balla et al., 2006), die bei Deletion zum Verlust der Cdc48 Interaktion führen kann (Qin Gang, persönliche Mitteilung).

Dieses Rx₅AAx₂R Motiv (Aminosäure 209-218) besitzt zwei zentrale Alaninreste, die N- und C-terminal von jeweils einem Argininrest flankiert werden. Deletiert man die zentralen Alaninreste dieses Motivs in Kombination mit Aminosäuresubstitutionen im SHP-Box-Motiv (Wss1^{SHPBoxAA}), so kann Wss1 in einem Y2H-Experiment nicht mehr an Cdc48 binden (**Abb. 17c**). Als Kontrolle dafür, dass die

Wss1-Variante noch richtig gefaltet und exprimiert wird, diente die Bindung von Wss1 an Ubc9.

Interessanterweise beeinträchtigt weder die Substitution ($wss1^{SHPBox}$) noch die Deletion ($wss1^{AA}$) der Cdc48-Interaktionsdomänen die Funktion von Wss1. Kombiniert man hingegen die Substitution bzw. Deletion dieser beiden Cdc48-Interaktionsdomänen ($wss1^{SHPBoxAA}$), so führt dies zum Verlust der Wss1 Funktion, da diese Interaktionsmutante nicht mehr in der Lage ist die HU-Sensitivität der WSS1-Deletion zu supprimieren (**Abb. 17d**). Als Kontrolle diente die Expression der Pd-Variante von Wss1.

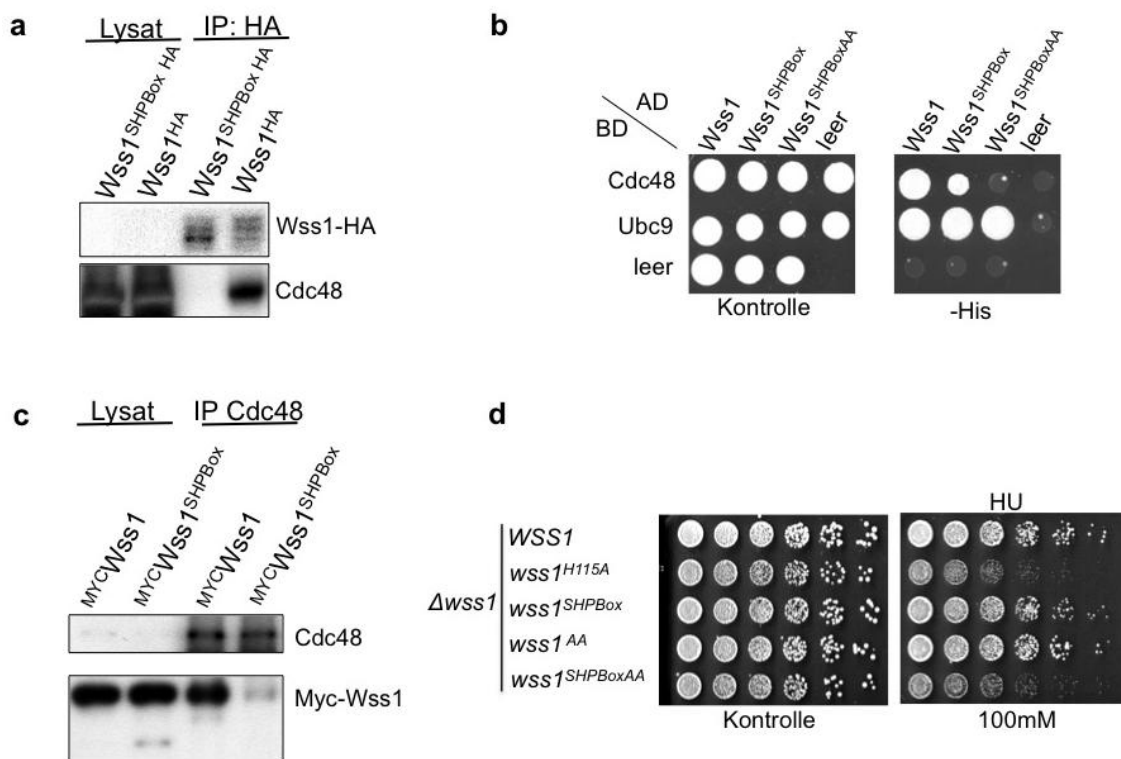


Abb. 17: Identifikation der Cdc48 Interaktionsdomänen auf Wss1.

a. HA-markiertes Wss1 bzw. die $Wss1^{SHPBox}$ -Variante unter eigenem Promotor wurde in $\Delta wss1$ exprimiert und Wss1 mit anti-HA Antikörpern aus Hefelysat spezifisch immunpräzipitiert. Nach stringenter Waschen und gelelektrophoretischer Auftrennung wurde Cdc48 im Western Blot spezifisch nachgewiesen. **b.** Immunpräzipitation von überexprimiertem HA-markiertem Wss1 und der $Wss1$ -SHP-Box-Variante in $\Delta wss1$. Cdc48 wurde aus Hefelysat mit anti-Cdc48 Antikörpern spezifisch präzipitiert und gebundenes Wss1 nach SDS-PAGE im Western Blot mit anti-Myc Antikörpern immundetektiert. **c.** Eine Aminosäuresubstitution der SHP-Box führt zu einer Reduktion der Interaktion von Wss1 mit Cdc48, eine Doppeldeletion beider Cdc48-Interaktionsdomänen hingegen zum kompletten Verlust der Interaktion im Y2H-Experiment. **d.** $\Delta wss1$ wurde mit $WSS1$ bzw. den Cdc48-Interaktionsvarianten von $WSS1$ unter eigenem Promotor komplementiert. Serielle Verdünnungsreihen wurden auf entsprechenden SC-Platten mit bzw. ohne HU ausgebracht und für 3 Tage bei 30°C inkubiert.

Auch wenn die SHP-Box das zentrale Cdc48-Interaktionsmotiv von Wss1 darzustellen scheint, so deuten einige Daten doch auf die Notwendigkeit einer zweiten sogenannten VIM-ähnlichen Cdc48-Interaktionsdomäne in Wss1 hin. Dabei ist die Cdc48-Interaktion scheinbar essentiell für die Funktion von Wss1. So ist eine Cdc48-Interaktionsdefiziente Variante von Wss1 (*wss1*^{SHPBoxAA}) unter HU-Bedingungen nicht mehr funktional. Dies spricht für den Charakter von Wss1 als neuer Cdc48 Kofaktor. Zusätzlich unterstreicht der Nachweis, dass Wss1 eine funktionale SHP-Box besitzt, die spezifisch für N-terminal bindende Kofaktoren von Cdc48 ist, dass die Bindung über die N-Domäne von Cdc48 stattfindet.

2.3.3 Genetische Interaktion von $\Delta wss1$ mit *cdc48-6*, *ufd1-2*, $\Delta shp1$, $\Delta ufd2$ sowie Genen die im proteasomalen Abbau involviert sind

Cdc48 und seine Kofaktoren spielen im proteasomalen Abbau von ubiquitylierten Proteinen eine Rolle. Den Mutanten des Ubiquitin/ Proteasom-Systems ist dabei gemein, dass viele eine erhöhte Temperatursensitivität bzw. Sensitivitäten gegenüber Stressbedingungen aufweisen (Finley et al., 1987; Jentsch et al., 1990). Bedingungen unter welchen es zu einer erhöhten Anzahl an falsch gefalteten Proteinen kommt. Aufgrund der Interaktion von Wss1 mit Cdc48 und ubiquitylierten Proteinen, sowie seiner Proteasedomäne lässt sich vermuten, dass auch Wss1 am Proteinabbau beteiligt sein könnte.

Dafür spricht ferner, dass eine *WSS1*-Deletion starke synthetische Phänotypen in Kombination mit der Proteasom-Mutante *cim3-1*, sowie einer Mutante der proteasomalen Untereinheit Rpn10 (**Abb. 18a**) besitzt. Rpn10 ist sowohl für die Rekrutierung von Substraten an das Proteasom als auch für dessen Assemblierung wichtig (Deveraux et al., 1994; Verma et al., 2004). Auch eine *WSS1*-Doppelmutante mit *RAD23* ($\Delta wss1 \Delta rad23$), das für einen weiteren Rekrutierungsfaktor für ubiquitylierte Proteine an das Proteasom kodiert bzw. eine $\Delta wss1 \Delta rpn10 \Delta rad23$ -Trippeldeletionsmutante, führt, verglichen mit den jeweiligen Einzel- bzw. Doppelmutanten, zu einer erhöhten Temperatursensitivität. Während die Einzeldelation von *WSS1* keine Sensitivitäten gegenüber Stressbedingungen, wie

Cycloheximid oder CdCl_2 , aufweist, besitzen Doppelmутanten von Δwss1 mit ufd1-2 , Δshp1 und Δufd2 einen synthetischen Phänotyp, d.h. sie wachsen unter diesen Bedingungen schlechter als die Einzelmутanten (Daten nicht gezeigt).

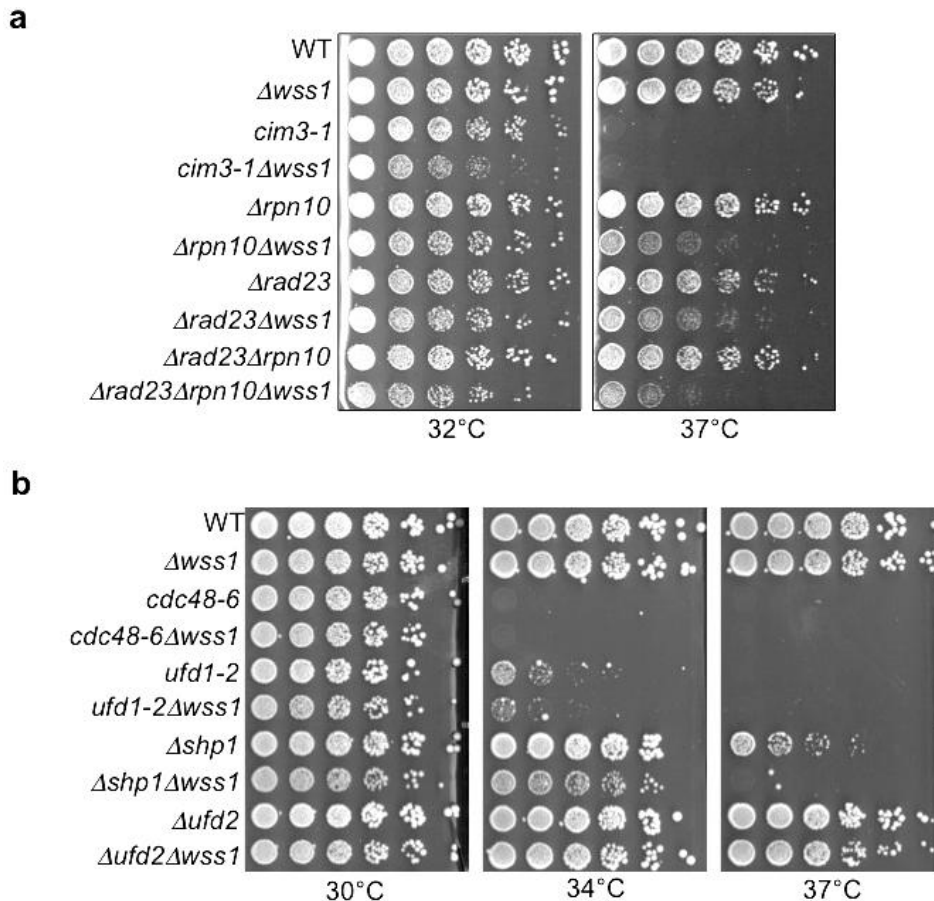


Abb. 18: WSS1 zeigt genetische Verbindungen zum proteasomalen Abbau.

a. Serielle Verdünnungsreihen von WSS1-Doppeldeletionsmutanten mit cim3-1 , Δrad23 , Δrpn10 bzw. $\Delta\text{rad23}\Delta\text{rpn10}$ wurden auf SC-Platten ausgebracht und für 3 Tage bei 30°C bzw. den angegebenen Temperaturen inkubiert. **b.** Doppeldeletionen von WSS1 mit cdc48-6 , ufd1-2 , Δshp1 bzw. Δufd2 wurden seriell verdünnt und auf SC-Platten ausgebracht. Die Inkubation erfolgte für 3 Tage zu den angegebenen Temperaturen.

Darüber hinaus führt eine WSS1-Deletion in ufd1-2 bzw. Δshp1 -Stammhintergründen zu einem stärkeren *ts*-Phänotyp (**Abb. 18b**), was auf eine partielle Redundanz von Wss1 mit diesen zwei Cdc48-Bindeproteinen schließen lassen könnte. Dies konnte durch eine Immunpräzipitation von HA-markiertem Wss1 in Δshp1 - bzw. ufd1-2 -Zelllysaten bestätigt werden. In diesen Stammhintergründen interagiert Wss1, verglichen mit einem WT-Hintergrund, verstärkt mit ubiquitylierten Proteinen (Daten nicht gezeigt). Ein weiteres Indiz für die Beteiligung von Wss1 am

proteasomalen bzw. Cdc48-abhängigen Abbau ist die teilweise Stabilisierung des ansonsten kurzlebigen Ubiquitin-Fusionproteins Ubiquitin-Prolin- β -Galaktosidase (Ub-P- β -Gal) in einem *Cycloheximid* (CHX) chase-Experiment (**Abb. 19a**). Durch Zugabe von CHX wird die Neusynthese von Proteinen inhibiert, sodass die Halbwertszeit von Proteinen analysiert werden kann. Dabei handelt es sich bei Ub-Pro- β -Gal um ein artifizielles Modells substrat, das über den sogenannten Ubiquitin-Fusion-Degradations (UFD)-Weg abgebaut wird. Hierbei ist Ubiquitin linear an die bakterielle β -Galaktosidase fusioniert, was zu einer raschen Ubiquitylierung und zum proteasomalen Abbau von β -Galaktosidase führt (Bachmair et al., 1986). Die teilweise Stabilisierung von Ub-P- β -GAL in $\Delta wss1$ lässt dabei auf eine Beteiligung am Cdc48-abhängigen Abbau vermuten, da auch Mutanten von Cdc48 und dessen Kofaktoren zu einer Stabilisierung dieses Proteins führen. Neben seiner Beteiligung am Ub-P- β -Gal Abbau ist ERAD die am besten verstandene Funktion von Cdc48. Zu diesem Zweck wurden die ERAD Substrate $^{HA}CPY^*$, $^{Myc}HMG2^{HA}$ bzw. Deg1-Sec62^{FLAG} in WT und $\Delta wss1$ exprimiert und ein CHX chase-Experiment durchgeführt (Daten nicht gezeigt bzw. **Abb. 19b**).

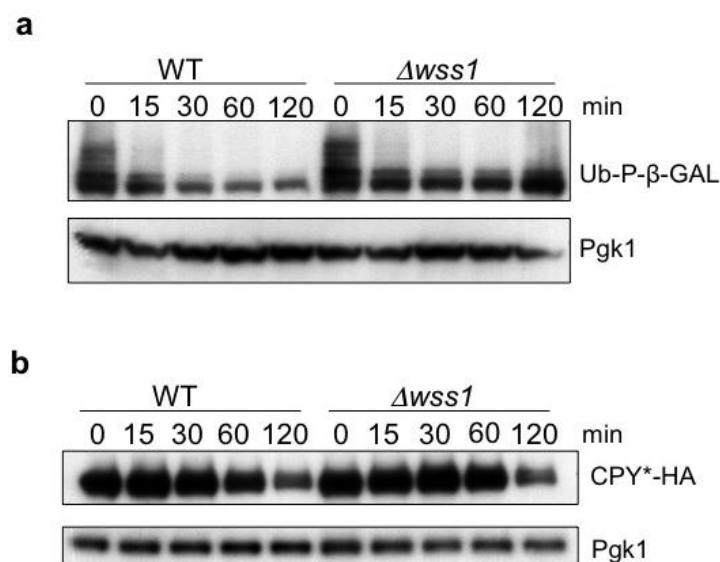


Abb. 19: Einfluß der WSS1-Deletion auf den Abbau von Ub-P- β -Gal und CPY*.

a. Analyse der Ub-P- β -Gal Stabilität im CHX chase-Experiment. Die angegebenen Stämme wurden bis zur logarithmischen Phase angezogen. Nach CHX-Zugabe wurde zu den angegebenen Zeitpunkten Aliquots genommen und die Proteinmenge von Ub-P- β -Gal durch Immundetektion bestimmt. Als Kontrolle diente Pgk1 **b.** Analyse des ERAD Substrates CPY* im WT- bzw. $\Delta wss1$ -Hintergrund im CHX chase-Experiment.

Bei Sec62 und HMG2 handelt es sich um membranständige ER-Proteine, während es sich bei CPY um ein lumenales, lösliches ER-Protein handelt. CPY* ist eine Mutante der normalerweise vom ER in die Vakuole sekretierten Carboxypeptidase Y. Im Gegensatz zur Stabilisierung von Ub-P- β -Gal in $\Delta wss1$ konnten im ERAD allerdings keine Unterschiede festgestellt werden. Der Grund mag darin liegen, dass Ub-P- β -Gal vorwiegend nukleär vorliegt und Wss1 daher nur an bestimmten Prozessen von Cdc48 beteiligt ist.

Aufgrund der genetischen und biochemischen Interaktionen sowie der teilweisen Stabilisierung von Ub-P- β -GAL lässt sich vermuten, dass Wss1 direkt am Abbau von nukleären Proteinen beteiligt sein könnte. Zudem scheint es sich bei Wss1 um einen neuen Kofaktor von Cdc48 zu handeln. Dabei bindet Wss1 über zwei Interaktionsdomänen vermittelt an die N-Domäne von Cdc48. Interessanterweise ist diese Cdc48-Interaktion essentiell für die Funktion von Wss1.

2.4 Identifikation und Beschreibung von Top1 als mögliches Wss1-Substrat

2.4.1 WSS1 interagiert genetisch mit *TDP1* und Mutanten des MRX-Komplexes

Da zunächst keine Substrate für Wss1 identifiziert werden konnten, wurde versucht durch genetische Studien herauszufinden in welchen Signalwegen Wss1 eine Rolle spielt. Dazu wurde ein Synthetischer Letalitäs (SL)-*screen* durchgeführt. Diese Analyse basiert auf der Idee, dass die Gendeletion eines Gens (GenA), die ansonsten keinen Phänotyp besitzt, in Kombination mit einer zusätzlichen Gendeletion (GenB) letal ist, wenn die Funktionen der Proteine für die GenA und GenB kodieren redundant sind oder wenn beide in parallelen Prozessen eine Rolle spielen. Dazu wird eine Gendeletion des zu untersuchenden Gens in eine *knock-out library* von nicht-lebensnotwendigen Genen eingebracht und nach Doppelmутanten mit einem Wachstumsdefekt oder synthetischer Letalität gesucht (Tong et al., 2001; Tong et al., 2004).

Dabei konnten im SL-screen mit $\Delta wss1$ die bereits bekannten, synthetisch-letalen Interaktoren *SGS1* und *TOP3* gefunden werden. Sgs1, das Hefe-Homolog der humanen RecQ-verwandten DNA-Helikasen BLM bzw. WRN, agiert u.a. im Komplex mit Topoisomerase 3 und löst spezielle DNA-Strukturen, wie *double Holliday junction intermediate* auf (Mullen et al., 2001). Zusätzlich konnten *MRE11*, *Rad50* und *TDP1* als synthetisch-letale Interaktoren von *WSS1* identifiziert werden.

Die Nuklease Mre11 und Rad50 bilden mit Xrs2 den sogenannten MRX-Komplex, der u.a. bei der homologen Rekombination eine Rolle spielt. Hierbei handelt es sich um einen DNA-Reparaturvorgang in der S- bzw. G2-Phase, bei dem der DNA-Bruch mit Hilfe des noch intakten homologen DNA-Abschnitts auf dem Schwesterchromatid repariert wird (Krogh und Symington, 2004). Dabei wird der MRX-Komplex als einer der ersten Faktoren an den DNA-Doppelstrangbruch rekrutiert und ist für die Generierung von einzelsträngiger DNA (ssDNA) durch Resektion zuständig. An die ssDNA kann sich in der Folge das heterotrimer RPA, bestehend aus Rfa1-3, anlagern, wodurch Sekundärstrukturen beseitigt werden. Über das DNA-Reparaturprotein Rad52 wird anschließend Rad51 an den RPA-DNA-Komplex rekrutiert. Dies bewirkt den Austausch von RPA gegen Rad51 und resultiert in der Ausbildung eines Rad51-Filaments an der ssDNA. Mit Hilfe des Rad51-Filaments kommt es daraufhin zum *annealing* mit dem homologen Strang, was letztendlich zur Neusynthese des DNA-Strangs und der fehlerfreien Reparatur führt. Nach Abschluß der DNA-Synthese werden spezielle DNA-Strukturen, wie *Holliday junctions*, u.a. von Sgs1 aufgelöst.

Durch seine endonukleolytische Aktivität ist der MRX-Komplex darüber hinaus in der Lage auf kovalent mit der DNA verknüpfte Topoisomerase1 (Top1) zu wirken. So schneidet der MRX-Komplex intern in der DNA und löst somit Top1 von der DNA los. (D'Amours und Jackson, 2002; Liu et al., 2002). Top1 relaxiert superspiralisierte DNA, die sich vor der Replikations- bzw. Transkriptionsmaschinerie aufbaut, indem es transiente Einzelstrang Brüche induziert. Anschließend rotiert die DNA um den intakten Strang und Top1 religiert den Bruch. Dabei kommt es kurzzeitig zur Ausbildung eines kovalenten Top1-DNA-Intermediates dem sogenannten *cleavage complex* oder auch Top1-DNA-Addukt genannt. Dieser Komplex ist in der Regel sehr kurzlebig, kann aber durch verschiedene DNA-Läsionen stabilisiert werden. Diese

Stabilisierung führt zur Kollisionen von Top1 mit der Replikations- oder Transkriptionsmaschinerie, woraus DNA-Schäden resultieren. Mehrere Proteine aus verschiedenen Reparaturwegen spielen bei der Reparatur dieses *cleavage complexes* eine Rolle, u.a. der bereits erwähnte MRX-Komplex.

Eine ähnliche Aufgabe wie der MRX-Komplex besitzt auch die Tyrosil-DNA-phosphodiesterase 1 (Tdp1). Dieses hoch konservierte Protein gehört zur Familie der Phospholipid-hydrolysierenden Enzyme und hydrolysiert die Bindung zwischen der 3'-DNA und dem Top1-Tyrosin, mit dem Top1 mit der DNA verknüpft ist (Interthal et al., 2001; Pouliot et al., 1999; Yang et al., 1996). Das dabei übrig bleibende 3'-Phosphat wird durch die redundanten Phosphatasen Apn1 und Apn2 sowie Tpp1 dephosphoryliert und der DNA Strang anschließend durch homologe Rekombination repariert (Pommier et al., 2003). Aus Strukturanalysen kann man darüberhinaus schließen, dass das Tyrosin, mit dem Top1 kovalent mit der DNA verknüpft ist, strukturell von Top1 verdeckt wird, d.h. nicht zugänglich ist für Tdp1. Eine interessante Interpretation dieser Daten besagt, dass das Top1-Protein daher zuerst geschnitten oder seine Konformation ändern muss, damit Tdp1 auf das Top1-DNA-Addukt agieren kann. Der genaue Mechanismus ist bisher nicht aufgeklärt, jedoch wird spekuliert, dass das Proteasom an diesem beteiligt sein könnte (Davies et al., 2003; Debethune et al., 2002). Neben Top1 kann Tdp1 auch auf 5' kovalent gebundene Topoisomerase 2 bzw. 3'-Phosphoglykolate agieren (Inamdar et al., 2002; Nitiss et al., 2006).

Die in dieser Arbeit neu gefundenen genetischen Interaktoren von *WSS1* wurden in dem im Labor verwendeten WT-Stamm (DF5) reproduziert. Dieser Stamm ist weniger temperatursensitiv als der im *SL-screen* verwendete WT-Hintergrund (BY4741). Die genetischen Interaktionen mit *MRE11* und *RAD50* zeigten daher in DF5 keine synthetischen Letalitäten, sondern syntetische Wachstumsdefekte (**Abb. 20a**). Den stärksten Wachstumsdefekt wies $\Delta wss1 \Delta tdp1$ auf.

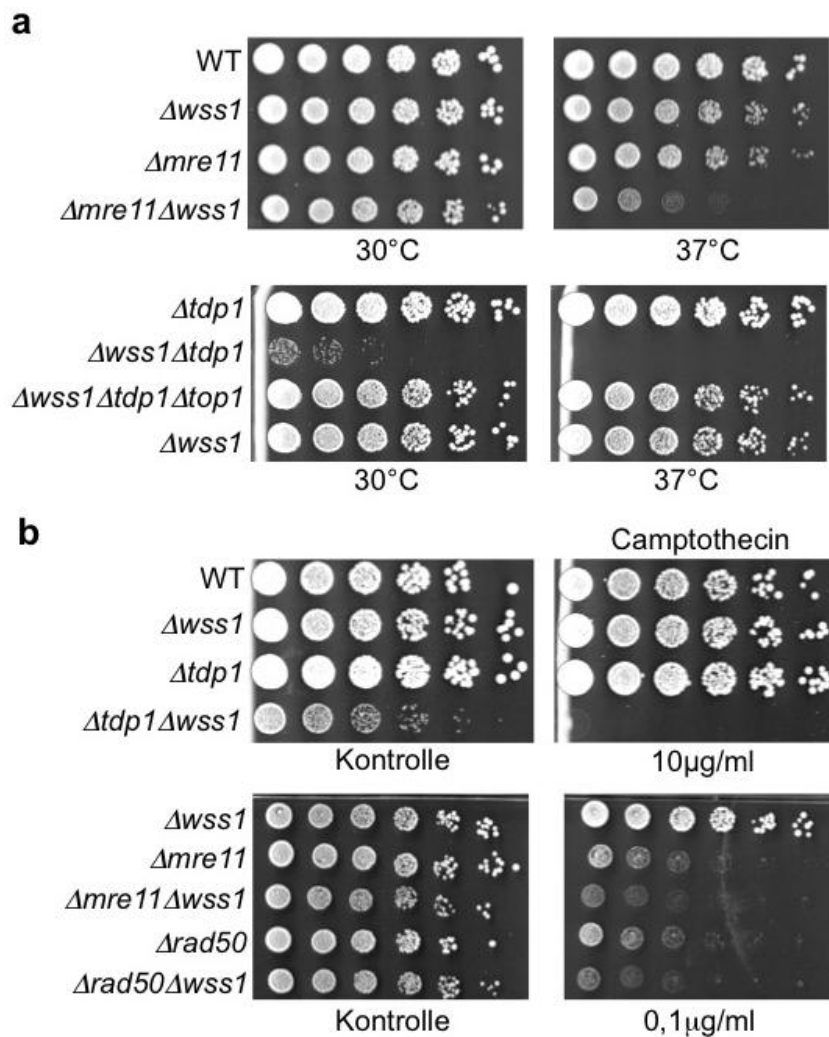


Abb. 20: Genetische Interaktion von *WSS1* mit *TDP1* und Mutanten des MRX-Komplexes.

a. Epistatische Analysen der $\Delta wss1$ -Mutante mit $\Delta tdp1$ und $\Delta mre11$. Serielle Verdünnungsreihen der Deletionsmutanten wurden auf SC-Platten ausgebracht und für 3 Tage bei den angegebenen Temperaturen inkubiert. **b.** *WSS1*-Deletion führt zu Camptothecin Sensitivität in $\Delta tdp1$ - bzw. MRX-Deletionsmutanten. Die Stämme aus **a.** wurden auf Camptothecin ausgebracht und für 3 Tage bei 30°C inkubiert.

Nachdem sowohl der MRX-Komplex, als auch Tdp1 an mehreren Prozessen in der Zelle beteiligt sind, d.h. auch mehrere Substrate besitzen, wurde genauer untersucht, ob kovalent gebundenes Top1 die Ursache der synthetischen Defekte darstellt. Eine Art dies zu untersuchen ist Top1 künstlich, durch Zugabe von Camptothecin, an die DNA zu binden. Camptothecin inhibiert den DNA-Religationsschritt von Top1 und stabilisiert so den bereits erwähnten *cleavage complex*, sodass sich Top1 nicht mehr von der DNA lösen kann. Die Toxizität von Camptothecin ergibt sich daraus, dass während der Replikation die

Replikationsmaschinerie mit dem *cleavage complex* kollidiert, wodurch es zu einem DNA-Doppelstrangbruch kommt. Gendelektionen von Proteinen, die eine Rolle beim Entfernen von Top1 von der DNA spielen sind daher in Kombination mit Gendelektionen der anderen Top1 Reparaturwege Camptothecin sensitiv. Interessanterweise weisen *WSS1*-Doppeldelektionen mit *MRE11* bzw. *TDP1* eine solche Camptothecin Sensitivität auf (**Abb. 20b**). Die *MRE11*-Deletion besitzt an sich schon eine starke Camptothecin-Sensitivität. Dies könnte damit begründet sein, dass der MRX Komplex bei mehreren Reparaturwegen eine Rolle spielt. Im Gegensatz dazu sind weder eine *TDP1*- noch eine *WSS1*-Einzeldelektion Camptothecin sensitiv.

Nachdem die biochemische Funktion von Tdp1 sehr gut beschrieben ist und Tdp1 nur wenige Substrate besitzt wurde im Folgenden ausschließlich die genetische Verbindung von *WSS1* mit *TDP1* genauer untersucht. Um zu unterstreichen, dass dabei Top1 den Wachstumsdefekt der $\Delta wss1 \Delta tdp1$ -Mutante hervorruft, wurde *TOP1* in $\Delta wss1 \Delta tdp1$ deletiert. Dadurch konnte der synthetische Defekt der Doppeldelation wieder supprimiert werden (**Abb. 20a**). Dies bedeutet, dass *TOP1* die Ursache des $\Delta wss1 \Delta tdp1$ -Phänotyps ist.

Wss1 wurde ursprünglich auch als Tof1 (*Top1 interacting factor 1*) Interaktor gefunden (O'Neill et al., 2004). Eine *TOF1*-Deletion konnte allerdings weder den $\Delta wss1 \Delta tdp1$ ts-Phänotyp retten, noch besaß eine $\Delta tdp1 \Delta tof1$ -Doppeldelationsmutante einen Phänotyp. Auch die SUMOylierung oder Stabilität von Tof1 war in $\Delta wss1$ nicht beeinflusst. Somit konnten keine Hinweise gefunden werden, dass der $\Delta wss1 \Delta tdp1$ Phänotyp mit Tof1 zusammenhängt (Daten nicht gezeigt).

Die Entdeckung, dass zwei Reparaturwege für Top1-DNA-Addukte in Kombination mit $\Delta wss1$ synthetische Wachstumsdefekte bzw. Camptothecin-Sensitivitäten aufweisen und dass die Letalität von $\Delta wss1 \Delta tdp1$ durch *TOP1*-Deletion gerettet werden kann, legt nahe, dass Wss1 bei der Reparatur dieser Top1-DNA-Addukte eine Rolle spielt. Dafür spricht auch die genetische Interaktion von *WSS1* mit *SGS1*. So kommt es nach der Prozessierung von DNA-gebundenem Top1 zur Ausbildung spezieller DNA-Strukturen, wie *Holliday junctions* bzw. *chicken foot* Strukturen. Damit es zum Neustart der Replikation kommen kann müssen diese von Sgs1/Top3 aufgelöst werden. Eine attraktive Interpretation der genetischen

Interaktion besagt, dass es in der Abwesenheit von *WSS1* zu einer vermehrten Zahl an *cleavage complexes* kommt, die Sgs1-abhängig repariert werden müssen.

Neben den erwähnten Reparaturwegen für DNA-gebundenes Top1 sind genetisch auch noch die Endonukleasen *RAD1/RAD10* und *MUS81/MMS4* als alternative Reparaturwege zu Tdp1 beschrieben worden (Liu et al., 2002; Vance und Wilson, 2002). Interessanterweise konnte jedoch keine der Endonukleasen im Letalitäts-screen mit $\Delta wss1$ gefunden werden. Dies lässt darauf schließen, dass Wss1 entweder mit diesen Endonukleasen funktional zusammenwirkt, oder aber die synthetische Letalität von *WSS1* mit Mutanten des MRX-Komplexes bzw. *TDP1* mit einer bestimmten Funktion von Topoisomerase 1 zusammen hängen könnte. Demnach würde diese Top1-Population überwiegend von Wss1, Tdp1 bzw. dem MRX-Komplex erkannt und repariert werden können.

2.4.2 Tdp1 interagiert mit SUMO, Cdc48 und Shp1

Synthetische Letalitäten zweier Gene sind oft dadurch begründet, dass die Proteinprodukte dieser Gene redundante Funktionen und dieselben Interaktionspartner bzw. Substrate besitzen können. Für Wss1 konnte bisher eine Interaktion mit Cdc48 und mit SUMOylierten Proteinen gezeigt werden. Auch Tdp1 kann zusammen mit SUMOylierten Proteinen, Cdc48 und Shp1 immunpräzipitiert werden (**Abb. 21a**).

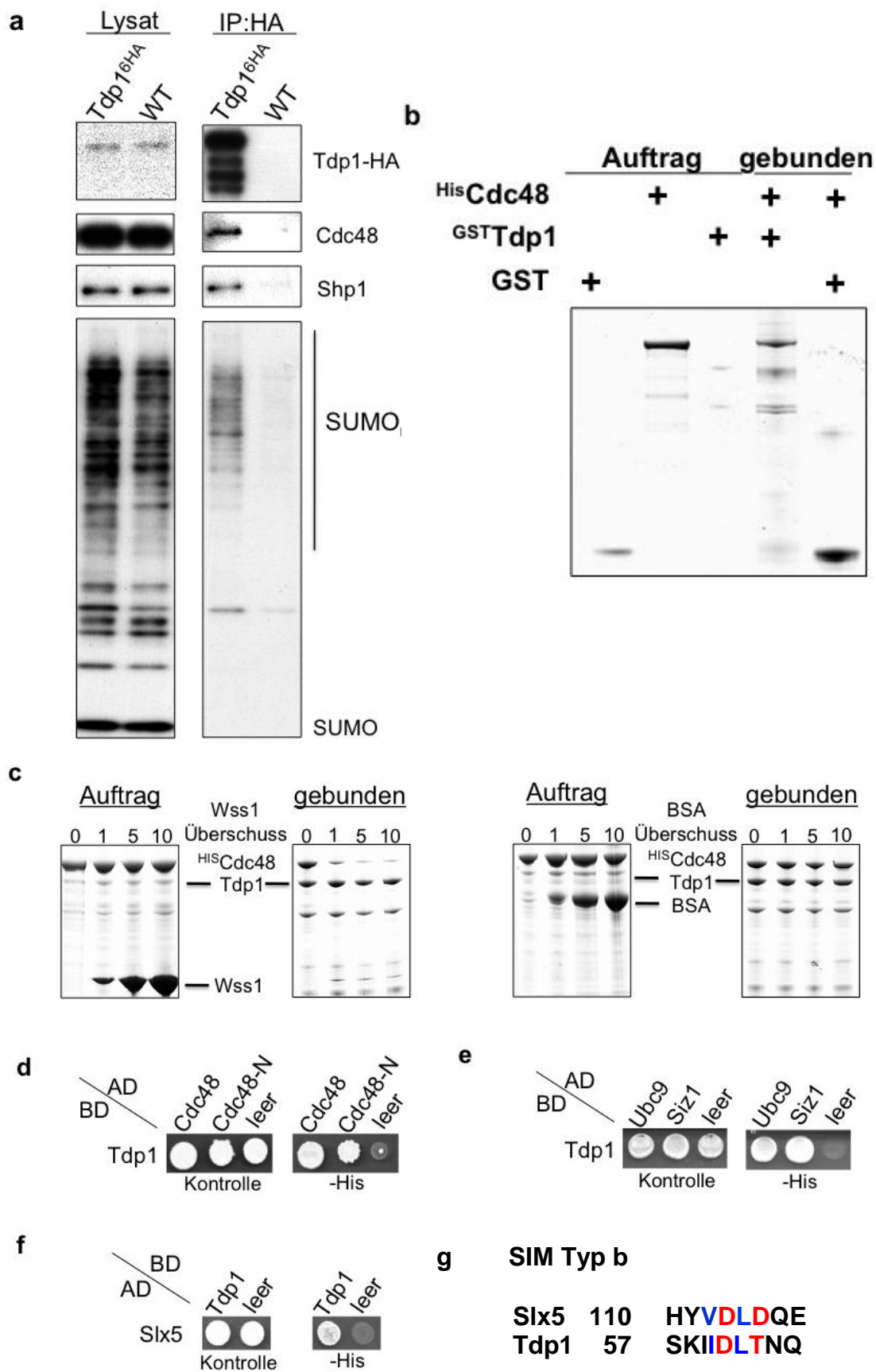


Abb. 21: Interaktionsstudien von Tdp1.

a. Immunpräzipitation von chromosomal exprimiertem 6HA-markiertem Tdp1. HA-Tdp1 wurde spezifisch mit anti-HA-Antikörper aus Hefelysat präzipitiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Präzipitiertes Tdp1, sowie gebundenes Cdc48, SUMO und Shp1 wurden mit spezifischen Antikörpern immundetektiert. **b.** GST bzw. GST-Tdp1 wurden mit rekombinantem Cdc48 für 2 Stunden inkubiert, mit Glutathion-*beads* präzipitiert und stringent gewaschen. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurde gebundenes Cdc48 mit Coomassie-Färbung nachgewiesen. **c.** Gst-Tdp1 wurde mit His-markiertem Cdc48 sowie mit ansteigenden Mengen an rekombinantem Wss1 oder BSA für 2 Stunden inkubiert. Gebundenes Cdc48 wurde durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. **d.** Tdp1 kann mit der N-Domäne von Cdc48 im Y2H-Experiment interagieren. **e.** Im Y2H-Experiment bindet Tdp1 an Proteine der SUMO-Kaskade. **f.** Interaktion von Tdp1 und Slx5. **g.** Sequenzvergleich von Tdp1 mit dem bekannten SIM von Slx5 zeigt, dass Tdp1 ein SIM Typ b besitzt. Die für die Bindung essentiellen Aminosäuren sind in blau und rot dargestellt.

Interessanterweise ist die Interaktion von Tdp1 mit Cdc48 in einem *cdc48-6*-Hintergrund stärker (Daten nicht gezeigt). In dieser Mutante akkumulieren Substrate von Cdc48 (Hoppe et al., 2000). Da die Cdc48-Substrate in *cdc48-6* nicht so schnell aus Komplexen gelöst bzw. an das Proteasom weitergereicht werden können, wird vermutet, dass auch Cdc48-Kofaktoren dadurch länger und stärker mit Cdc48 interagieren. Auch Tdp1 interagiert in einem *cdc48-6*-Hintergrund verstärkt mit Cdc48 (Daten nicht gezeigt). Dafür, dass Tdp1 ein neuer Kofaktor von Cdc48 ist, sprechen auch folgende Daten. So ist die Halbwertszeit von Tdp1 in einem *CHX chase*-Experiment in *cdc48-6*, verglichen mit einem WT-Hintergrund, nicht verändert. Dies lässt vermuten, dass Tdp1 höchstwahrscheinlich ein funktionaler Interaktor und kein Substrat von Cdc48 ist (Daten nicht gezeigt). Um diese Vermutung zu überprüfen wurde GST-Tdp1 aus *E.coli* aufgereinigt und mit rekombinantem ^{His}Cdc48 inkubiert. In Übereinstimmung mit den *in vivo* Daten kann Tdp1 auch *in vitro* mit Cdc48 interagieren (**Abb. 21b, c**).

Demnach sind sowohl Wss1 als auch Tdp1 neue Bindeproteine von Cdc48, die des Weiteren auch genetisch miteinander verknüpft sind. Eine mögliche Erklärung für die genetische Interaktion wäre, dass sie redundante Aufgaben besitzen und daher beide um die Cdc48-Bindung konkurrieren. Aus diesem Grund weist die Doppeldeletion ($\Delta wss1 \Delta tdp1$) einen starken *ts*-Phänotyp auf. Um die Idee der kompetitiven Cdc48-Interaktion zu testen, wurde der *in vitro* Bindeversuch von GST-Tdp1 und ^{His}Cdc48 mit rekombinantem Wss1, in ansteigender Menge, wiederholt. Als Negativkontrolle wurde BSA in ansteigender Menge zugegeben.

Interessanterweise führt dabei die gleichzeitige Zugabe von Wss1 zu einem Verlust der Tdp1-Cdc48 Interaktion (**Abb. 21c**). Die restliche Bindung von Cdc48 und Wss1 an Gst-Tdp1 entspricht der unspezifischen Bindung beider Proteine mit GST. Es kommt also nicht zur Ausbildung eines tertiären Wss1-Cdc48-Tdp1-Komplexes (Daten nicht gezeigt). Prä-inkubiert man in diesem Bindungsexperiment GST-Tdp1 mit Cdc48, bevor man Wss1 dazugibt, so kann die Tdp1-Cdc48 Interaktion nicht mehr durch Wss1-Zugabe inhibiert werden. Dies könnte dafür sprechen, dass Wss1 und Tdp1 dieselbe Interaktionsdomäne auf Cdc48 besitzen. In Übereinstimmung damit bindet auch Tdp1, wie Wss1, in einem Y2H-Experiment an die N-Domäne von Cdc48 (**Abb. 21d**).

Es bleibt festzuhalten, dass dieser *in vitro* Befund allerdings nicht ausschließt, dass Wss1, Tdp1 und Cdc48 *in vivo* funktional zusammenarbeiten, auch wenn eine Tdp1-Wss1 Interaktion nicht nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Interessanterweise interagieren sowohl Wss1 als auch Tdp1 mit SUMOylierten Proteinen und Komponenten des Ubiquitin-abhängigen Proteinabbaus. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob auch Tdp1 mit Komponenten der SUMO-Kaskade bzw. mit der SUMO-spezifischen Ubiquitin-Ligase Slx5 interagieren kann. In einem Y2H-Experiment konnte sowohl eine Interaktion mit dem SUMO-E2 Ubc9 und der SUMO-Ligase Siz1, als auch mit der Ubiquitinligase Slx5 nachgewiesen werden (**Abb. 21e,f**). Für Tdp1 wurde zudem bioinformatisch gezeigt, dass es ein SIM des Typs b besitzt. (**Abb. 21g**). Auch Tdp1 könnte daher in der Lage sein nicht-kovalent mit SUMOylierten Proteinen zu interagieren. Ein naheliegendes SUMO-Substrat ist dabei Top1, da dieses scheinbar SUMO-abhängig reguliert wird (siehe nächster Abschnitt)

Die genetischen und biochemischen Interaktionen von Tdp1 und Wss1 legen das Arbeitsmodell nahe, dass es sich um zwei neue Kofaktoren von Cdc48 handelt, die beide beim SUMO-abhängigen Top1-Abbau eine Rolle spielen könnten.

2.4.3 Genetische Analyse der $\Delta wss1 \Delta tdp1$ -Deletionsmutante

In den letzten Jahren konnte mehrfach gezeigt werden, dass Komponenten der SUMO-Kaskade genetisch und physisch mit *TOP1* wechselwirken. So kann die Temperatursensitivität der Doppelmutante der SUMO E3-Ligasen $\Delta siz1 \Delta siz2$, sowie eine *ULP2*-Deletion durch *TOP1*-Deletion gerettet werden. Zudem konnte eine *ubc9*-Mutante (*ubc9-10*) in einem screen für hypersensitive Stämme gegen Top1^{T722A}-Überexpression, eine Top1-Variante die konstitutiv an der DNA hängt und zu *cleavage complex* Formation führt, isoliert werden. Darüberhinaus sind *ubc9ts*- und $\Delta ulp2$ -Stämme Camptothecin sensitiv (Jacquiau et al., 2005).

Neben der genetischen Interaktionen von *TOP1* mit *UBC9*, interagieren Top1 und Ubc9 auch physisch. Zudem ist Top1 ein SUMO-Substrat und wird in Hefe überwiegend von den zwei SUMO-Ligasen Siz1 und Siz2 SUMOyliert (Chen et al., 2007). Für humanes Top1 konnte darüberhinaus gezeigt werden, dass die SUMOylierung von Top1 durch Zugabe von Camptothecin induziert werden kann und dass die mit SUMO-modifizierte Form von Top1 kovalent mit der DNA verknüpft ist (Horie et al., 2002).

Eine interessante Vermutung ist daher, dass die *ts*- und Camptothecin-Sensitivität der $\Delta wss1 \Delta tdp1$ -Mutante mit der SUMOylierten Form von Top1 zusammenhängt. Diese würde bedeuten, dass eine $\Delta siz1 \Delta siz2$ -Doppeldelation den $\Delta wss1 \Delta tdp1$ -Phänotyp supprimieren könnte. Tatsächlich besitzt dieser genetische Hintergrund ($\Delta wss1 \Delta siz1 \Delta siz2 \Delta tdp1$) eine geringere Temperatursensitivität als eine $\Delta wss1 \Delta tdp1$ Doppelmutante und besitzt denselben *ts*-Phänotyp wie die Trippelmutante $\Delta wss1 \Delta siz1 \Delta siz2$ (**Abb. 22 a,b**). Die Deletion von *TDP1* in $\Delta wss1 \Delta siz1 \Delta siz2$ führt demnach zu keinem zusätzlichen Wachstumsdefekt der Trippelmutante. Ersichtlich wird auch, dass eine *WSS1*-Deletion in $\Delta siz1 \Delta siz2$ zu einer erhöhten Temperatursensitivität der Doppelmutante führt.

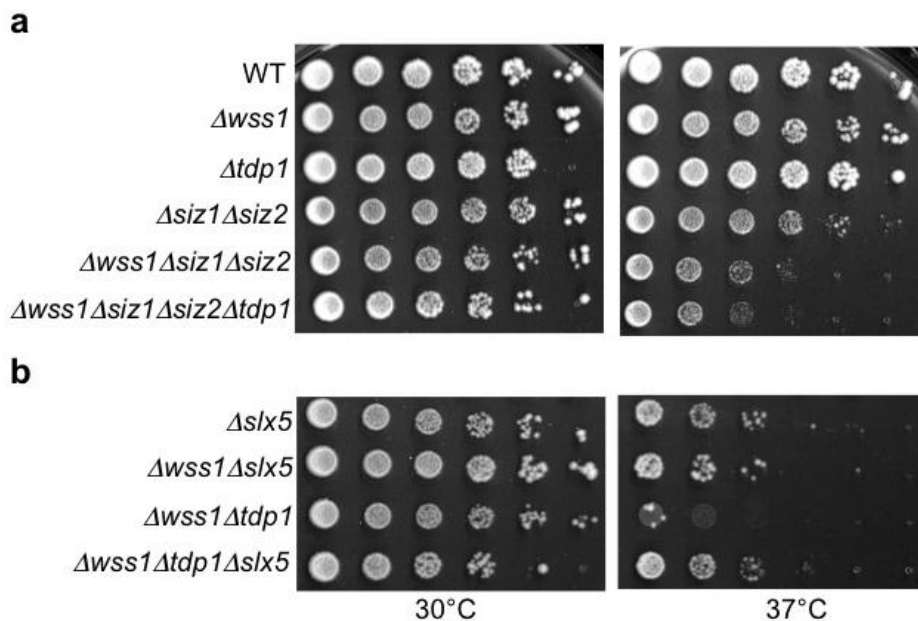


Abb. 22: Genetische Suppression des $\Delta wss1 \Delta tdp1$ ts-Phänotyps.

a. Serielle Verdünnungsreihe von $\Delta wss1 \Delta tdp1$ Trippel- und Quadrupelmутanten, sowie der entsprechenden Einzel- bzw. Doppelmутanten. Die Verdünnungen wurden auf SC-Platten ausgebracht und für 3 Tage bei 30°C bzw. 37°C inkubiert. **b.** wie **a.** $\Delta wss1 \Delta tdp1$ in Kombination mit $\Delta slx5$.

Die SUMOylierung von Top1 und die Interaktion von Wss1 und Tdp1 mit der SUMO-abhängigen Ubiquitin-Ligase Slx5 legen nahe, dass auch eine mögliche Slx5-abhängige Ubiquitylierung der SUMOylierten Form von Top1 den Phänotyp hervorrufen könnte. In Einklang mit dieser Vermutung führt auch eine *SLX5*-Deletion in $\Delta wss1 \Delta tdp1$ zu einem verbessertem Wachstum (**Abb. 22b**).

Daraus lässt sich vermuten dass ein SUMOyliertes und/ oder ubiquityliertes Substrat die Toxizität in $\Delta wss1 \Delta tdp1$ hervorruft. Um genau klären zu können, ob Top1 das Substrat der Siz1- und Siz2-abhängigen SUMOylierung bzw. einer Slx5-abhängigen Ubiquitylierung ist, müssten die entsprechenden SUMO- bzw. ubiquitylierungsdefizienten Varianten von Top1 getestet werden. Die Lysinreste für SUMOyliertes Top1 sind bereits beschrieben. Allerdings führte eine Substitution dieser Lysinreste (K65, K91, K92) nicht zu einem Verlust der SUMOylierung von Top1 im DF5-Stammhintergrund. Von einer Verwendung dieser Lysin-Variante (Top1^{KKKRRR}) wurde daher abgesehen (Daten nicht gezeigt).

Die Suppression des ts-Phänotyps von $\Delta wss1 \Delta tdp1$ durch $\Delta slx5$ legt nahe, dass es sich bei dem Substrat um ein Protein handelt, welches SUMO-abhängig degradiert werden muss. In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob die

Proteaseaktivität ($wss1^{H115A}$) bzw. die Interaktion mit SUMO ($wss1^{SIM}$) und Cdc48 ($wss1^{SHPBox}$, $wss1^{AA}$ bzw. $wss1^{SHPBox AA}$) für die Funktion von Wss1 wichtig ist. Dazu wurden Wss1-WT, die Pd-Wss1-Variante und die SUMO bzw. Cdc48-Interaktionsdefizienten Varianten von Wss1 in $\Delta wss1 \Delta tdp1$ unter eigenem Promotor exprimiert und auf Temperatur- bzw. Camptothecin-Sensitivität getestet. Wie zu erwarten besitzt die Pd-Variante ($wss1^{H115A}$) den stärksten Phänotyp (**Abb. 23**). Eine Kombination beider Cdc48-Interaktionsdefizienten Varianten ($wss1^{SHPBox AA}$) führt beachtenswerterweise ebenfalls zu einem Verlust der Funktionalität von Wss1. Der Funktionsverlust der Cdc48-Interaktionsdefizienten Variante von Wss1 ($wss1^{SHPBox AA}$) konnte auch schon im Zusammenhang mit der fehlenden Supprimierung der HU-Sensitivität von $\Delta wss1$ festgestellt werden (siehe Abb. 10). Dieser Funktionsverlust spricht dafür, dass die Interaktion von Wss1 mit Cdc48 essentiell für die Funktion von Wss1 ist.

Eine Deletion von *TOP1* in $\Delta wss1 \Delta tdp1 wss1^{SHPBox AA}$ kann den *ts*- bzw. Camptothecin-sensitiven Phänotyp supprimieren. Dies lässt vermuten, dass Top1 in diesem Stammhintergrund ein toxisches Substrat ist. Die Tatsache, dass das SIM für die Funktion von Wss1 nicht essentiell ist, ist höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass Wss1 über Cdc48 an das SUMOylierte Substrat binden und dieses schneiden kann. Die SIM-vermittelte Interaktion könnte daher eine stabilisierende Wirkung für die Wss1-Substrat-Interaktion besitzen.

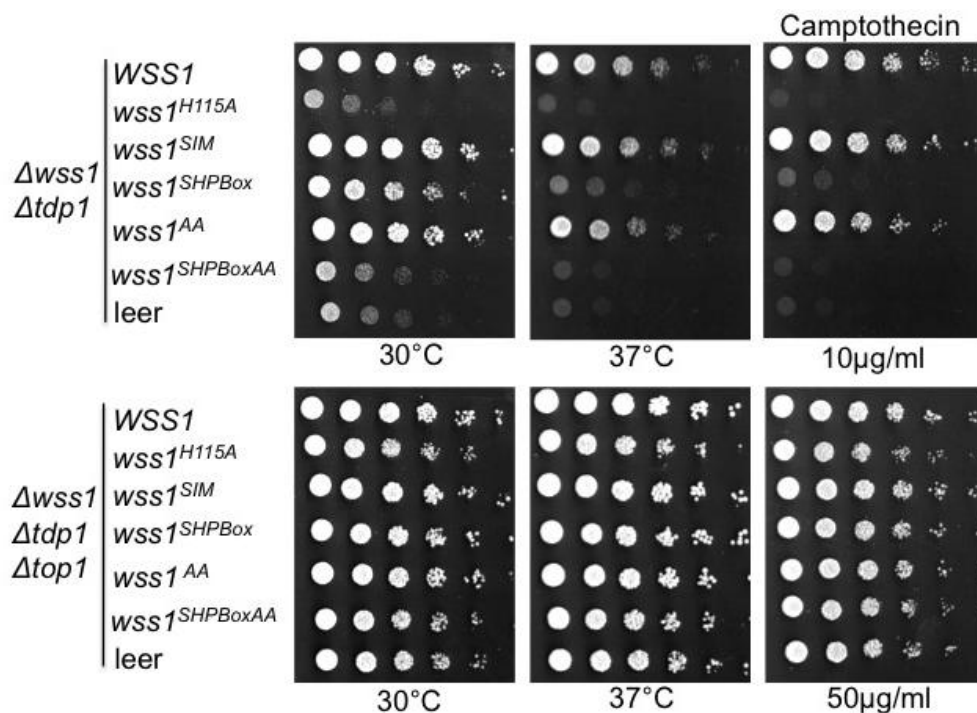


Abb. 23: Analyse der $\Delta wss1 \Delta tdp1$ -Komplementation mit *WSS1* bzw. *WSS1*-Varianten.

Wss1 bzw. Varianten von *Wss1*, unter eigenem Promotor, wurden in $\Delta wss1 \Delta tdp1$ eingebracht und auf Suppression des $\Delta wss1 \Delta tdp1$ -Phänotyps getestet. Serielle Verdünnungen der Hefestämme wurde auf SC-Platten mit bzw. ohne Camptothecin-Zusatz ausgebracht und bei den angegebenen Temperaturen für 3 Tage inkubiert.

Bei Cdc48 handelt es sich um eine Ubiquitin-spezifische Segregase. Eine plausible Erklärung für die zuvor beschriebenen genetischen Interaktionen ist daher, dass die SUMOylierten Interaktoren von *Wss1* zuerst ubiquityliert werden müssen, damit *Wss1* über Cdc48 an diese rekrutiert wird. Ein Kandidat für diese Ubiquitylierung ist das STUBL *Slx5*. So ist die *Slx5*-abhängige Ubiquitylierung eines Proteins essentiell für den toxischen Effekt der $\Delta wss1 \Delta tdp1$ Mutante (siehe Abb.21.) und die Doppeldeletionsmutante $\Delta wss1 \Delta slx5$ ist darüber hinaus epistatisch (**Abb. 24a**), d.h., dass eine $\Delta slx5 \Delta wss1$ -Mutante sich wie $\Delta slx5$ verhält und *WSS1* und *SLX5* daher epistatisch sind. Dies spricht somit dafür, dass beide Proteine im selben Prozessweg eine Rolle spielen. Interessanterweise ist $\Delta slx5$ zudem der einzige genetische Hintergrund, in dem eine *WSS1*-Deletion zu keinem additiven Effekt unter HU-Bedingungen führt (siehe auch Abschnitt 2.5).

Aus diesem Grund wurde getestet, ob die Interaktion von *Wss1* mit SUMOylierten Proteinen von *Slx5* abhängt. Dazu wurde *Wss1* (*Wss1^{HA}*) aus WT- bzw. $\Delta slx5$ -Hefestämmen immunpräzipitiert und gebundene SUMOylierte Proteine

im Immunblot spezifisch nachgewiesen (**Abb. 24b**). Interessanterweise führte eine *SLX5*-Deletion zu einer deutlichen Reduktion von gebundenen SUMOylierten Proteinen mit Wss1. Dies spricht für das Arbeitsmodell, dass Wss1 über Cdc48 an SUMOylierte Proteine bindet, die zuvor Slx5-abhängig ubiquityliert wurden.

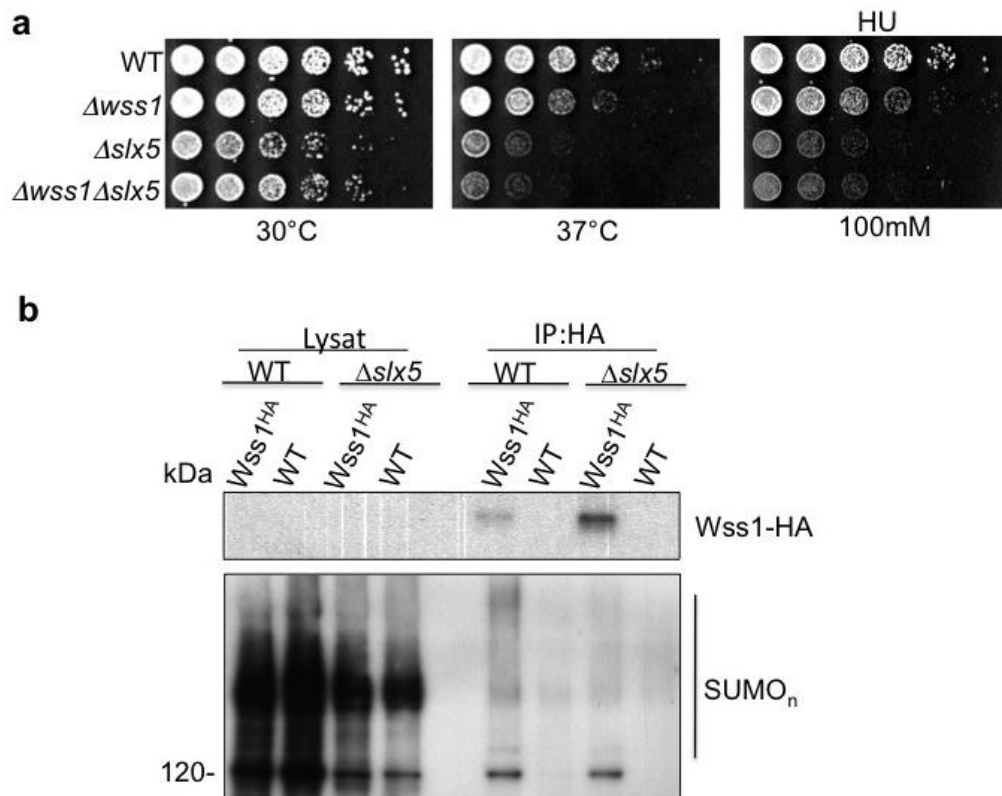


Abb. 24: Analyse der Wss1-Slx5-Interaktion.

a. Serielle Verdünnungsreihen der angegebenen Deletionsmutanten wurden auf SC-Platten mit bzw. ohne HU ausgebracht und für 3 Tage bei 30°C inkubiert. **b.** HA-Wss1 wurde aus WT- bzw. *SLX5*-Deletionsstämmen immunpräzipitiert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurden SUMOylierte Proteine mit anti-SUMO-Antikörper nachgewiesen.

2.4.4 *WSS1* und *TDP1* interagieren genetisch mit dem deSUMOylierenden Enzym *ULP2*

Nachdem ein oder mehrere SUMOylierte Proteine in $\Delta wss1 \Delta tdp1$ toxisch zu sein scheinen, Top1 SUMOyliert wird und Tdp1 mit SUMOylierten Proteine interagiert, war eine attraktive These, dass Tdp1 auf SUMOyliertes Top1 agiert. Wenn dem so wäre, so müsste eine *TDP1*-Deletion in $\Delta ulp2$ zu einer zusätzlichen

Camptothecin Sensitivität führen, da in diesem Stammhintergrund SUMOyliertes Top1 stabilisiert ist. In der Tat führt die Induktion des Top1 *cleavage complexes* durch Camptothecin-Zugabe in $\Delta ulp2 \Delta tdp1$ zu Letalität (**Abb. 25a**). Wie erwartet, kann dieser Top1-spezifische Phänotyp durch Deletion von *TOP1*, interessanterweise aber auch durch Überexpression von *WSS1*, gerettet werden (**Abb. 25b**). Die Protease-defiziente Wss1-Variante ist dazu nicht in der Lage. Eine attraktive Erklärung dafür ist, dass in Abwesenheit von *TDP1* und *ULP2* SUMOyliertes Top1 an der DNA akkumuliert und Wss1, als teilweise redundanter Prozessweg zu Tdp1, auf Top1 proteolytisch agieren kann.

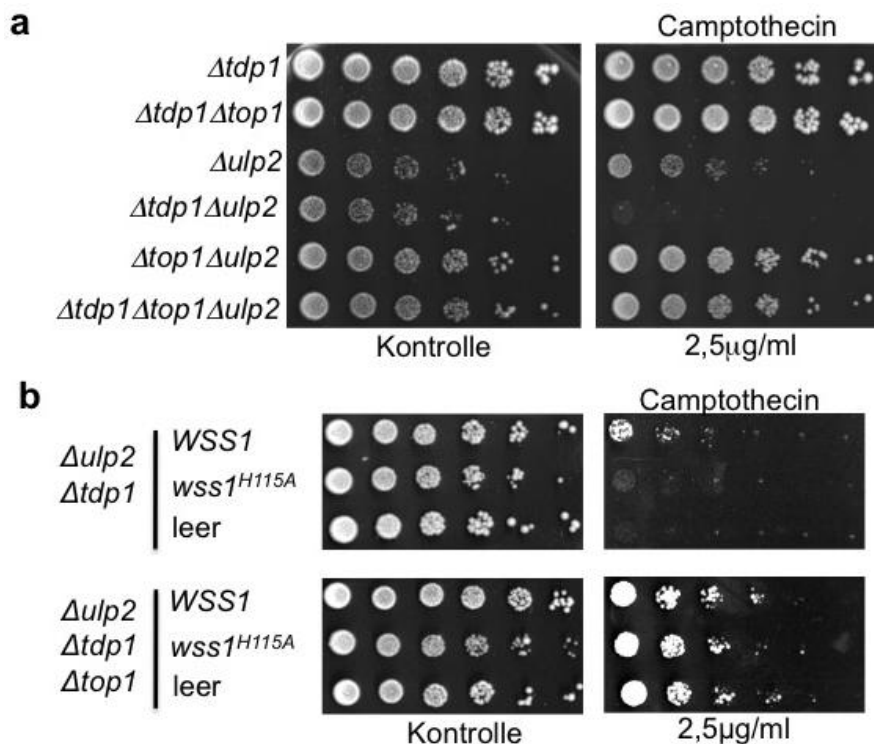


Abb. 25: Genetische Interaktion von $\Delta ulp2$ und $\Delta tdp1$.

a. Eine *TDP1*-Deletion in $\Delta ulp2$ führt zu Camptothecin-Sensitivität. Gleiche Mengen an Zellen wurden in serieller Verdünnung mit bzw. ohne Camptothecin-Zugabe für 3 Tage bei 30°C inkubiert. **b.** Suppression der $\Delta ulp2 \Delta tdp1$ Camptothecin Sensitivität durch Wss1-Überexpression.

Johnson *et al.* konnte zeigen, dass mit PolySUMO-Ketten modifizierte Proteine der Grund sind, warum eine Deletion des deSUMOylierenden Enzyms *ULP2* zu Wachstumsdefekten führt. Eine Substitution der für die PolySUMO-Kettenbildung wichtigen Lysinreste in SUMO konnte den $\Delta ulp2$ *ts*-Phänotyp ebenso retten, wie eine Deletion von *TOP1*. Dies wird damit erklärt, dass die Akkumulierung von

polySUMOylierten Proteinen, wie z.B. von SUMOyliertem Top1, in diesem Stammhintergrund toxisch ist und diese daher abgebaut werden müssen. In dieselbe Richtung geht auch der Befund, dass eine *ULP2*-Gendeletion bzw. eine *ubc9ts*-Mutante Camptothecin-sensitiv sind. Zudem besitzen beide eine erhöhte Sensitivität gegenüber einer konstitutiv an die DNA-gebundenen Top-Variante (Top1T^{722A})(Jaquia et al., 2005). Eine Erklärung dafür ist, dass kovalent mit der DNA verknüpfte Top1 zuerst SUMOyliert werden muss, um abgebaut werden zu können. In Übereinstimmung damit sind Gendeletionen von Proteinen, die beim Abbau dieser SUMO-Substrate eine Rolle spielen könnten in Kombination mit $\Delta ulp2$ letal, wie eine $\Delta ulp2 \Delta slx5$ Doppeldeletionsmutante (Daten nicht gezeigt).

Bei genetischen Analysen von *WSS1* wurde festgestellt, dass eine *WSS1*-Deletion in der Lage ist den $\Delta ulp2$ *ts*-Phänotyp zu supprimieren (**Abb. 26**). Diese Suppression beruht vermutlich auf der schnelleren Degradation von polySUMOylierten Proteinen (siehe auch Abschnitt 2.4.5). Diese Degradation erfolgt in *S. cerevisiae* über die Ubiquitin-Ligasen Slx5, Slx8 und Ris1. In Übereinstimmung mit der These, dass $\Delta wss1$ zum schnelleren STUBL-abhängigen Abbau von SUMOylierten Proteinen führt können Gendeletion von *SLX5*, *SLX8* und *RIS1* den $\Delta ulp2 \Delta wss1$ -Wachstumsphänotyp wiederum verschlechtern (**Abb. 26** bzw. Daten nicht gezeigt). Bemerkenswerterweise ist eine *SLX5*-Deletion in $\Delta ulp2$ nicht letal, wenn *WSS1* ebenso deletiert ist.

Dafür sprechend, dass Top1 ein toxisches polySUMOyliertes Protein ist, das Slx5-abhängig abgebaut wird, kann eine *TOP1*-Deletion den $\Delta wss1 \Delta ulp2 \Delta slx5$ -Phänotyp wiederum supprimieren. So besitzt die Quadrupelmutante $\Delta ulp2 \Delta wss1 \Delta slx5 \Delta top1$ keinen *ts*-Phänotyp (Daten nicht gezeigt). Zudem führt bereits die *TOP1*-Deletion in $\Delta ulp2$ zu einem besseren Wachstum, allerdings nicht so stark, wie die Deletion von *WSS1* in $\Delta ulp2$. Die Trippelmutante $\Delta wss1 \Delta ulp2 \Delta top1$ verhält sich hingegen wie $\Delta wss1 \Delta ulp2$. Dies spricht dafür, dass die Suppression der *WSS1*-Deletion in $\Delta ulp2$ auf dem schnelleren Abbau von mehreren SUMOylierten Proteinen beruht, hauptsächlich jedoch auf dem Abbau von SUMOyliertem Top1.

Interessant ist auch, dass der *ts*-Phänotyp des zweiten bekannten deSUMOylierenden Enzyms, *ulp1-ts*, nicht durch eine *WSS1*-Deletion supprimiert werden kann. Im Gegensatz zu Ulp2, wirkt Ulp1 eher auf monoSUMOylierte Proteine

und eine *ulp1ts*-Mutante führt daher auch nicht zur Akkumulierung von polySUMOylierten Proteinen.

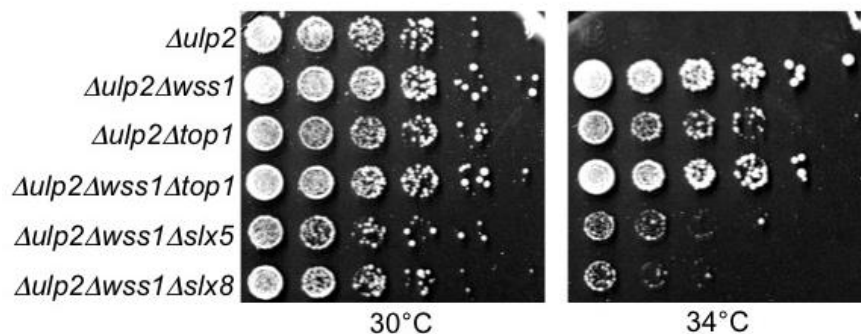


Abb. 26: Epistasis-Analysen von $\Delta ulp2$ und $\Delta wss1$.

Eine *WSS1*-Deletion supprimiert den $\Delta ulp2$ *ts*-Phänotyp. Serielle Verdünnungsreihen der angegebenen Stämme wurden auf SC-Platten ausgebracht und bei 30°C für 3 Tage inkubiert.

2.4.5 $\Delta wss1$ führt zum schnelleren Abbau von Top1

Da die genetischen Daten auf SUMOyliertes Top1 als Wss1-Substrat hindeuten wurde zunächst die SUMOylierung von Top1 im WT- bzw. $\Delta wss1$ -Hintergrund untersucht.

Dazu wurde His-Epitop markiertes SUMO in $\Delta smt3$ bzw. $\Delta smt3 \Delta wss1$ überexprimiert und SUMOylierte Proteine über Ni-NTA-Chromatographie denaturierend aufgereinigt. Anschließend wurde die SUMOylierte Form von Top1 im Immunblot analysiert (**Abb. 27**). Entgegen der Erwartung, dass Wss1 proteolytisch auf SUMOyliertes Top1 wirken könnte und SUMOyliertes Top1 in $\Delta wss1$ daher stabilisiert ist, zeigte sich, dass im $\Delta wss1$ -Stamm sowohl die SUMOylierte- wie auch die unmodifizierte Form von Top1 reduziert ist. Nachdem scheinbar vor allem die SUMOylierte Form von Top1 in $\Delta wss1$ stark reduziert ist, läßt sich vermuten, dass Top1 höchstwahrscheinlich SUMOylierungsabhängig abgebaut werden könnte. Dies würde die zuvor erläuterten genetischen Daten bestätigen.

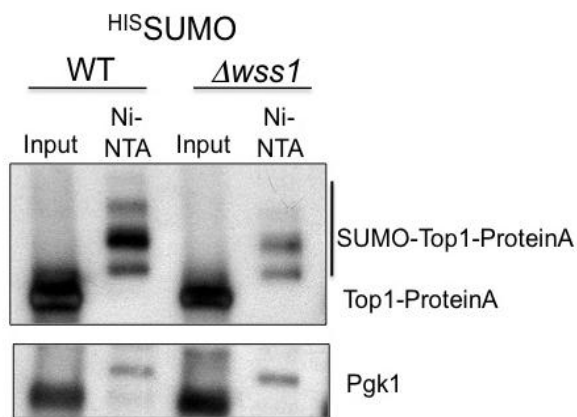


Abb. 27: Aufreinigung von SUMOyliertem Top1.

His-SUMO wurde mittels Ni-NTA Chromatographie denaturierend aus WT- bzw. $\Delta wss1$ -Stämmen aufgereinigt und ProteinA-markiertes Top1 immun-detektiert.

Für humanes Top1 konnte gezeigt werden, dass nach Camptothecin-Zugabe vor allem SUMOyliertes Top1 mit der DNA-verknüpft ist und Top1 nach Camptothecin-Zugabe degradiert wird. Dies führt bei anhaltender Camptothecin-Behandlung der Zellen zur allmählichen Depletion von Top1. Interessanterweise ähnelt dieser Phänotyp der verringerten Top1-Proteinmenge im *WSS1*-Deletionshintergrund. Da auch im $\Delta wss1$ -Hintergrund die Proteinmenge von Top1 reduziert ist wurde untersucht, ob sich dieser Effekt durch Camptothecin-Behandlung der Zellen noch verstärken lies. Dabei führte die Zugabe von Camptothecin in allen Stammhintergründen zu einer Reduktion der Top1-Proteinmenge, d.h. sowohl im WT- als auch im $\Delta wss1$ -Stammhintergrund (**Abb. 28a**). Der Unterschied zwischen dem WT- und dem $\Delta wss1$ -Stamm ist deutlicher zu sehen, wenn man sich die Top1-Proteinmenge im His-SUMO-Überexpressions-Hintergrund anschaut (**Abb. 28b**). So führt die erhöhte SUMOylierung von Substraten in der Zelle zu einer deutlicheren Reduktion der Top1-Proteinmenge in Camptothecin-behandelten $\Delta wss1$ -Zellen, verglichen mit dem WT-Stamm.

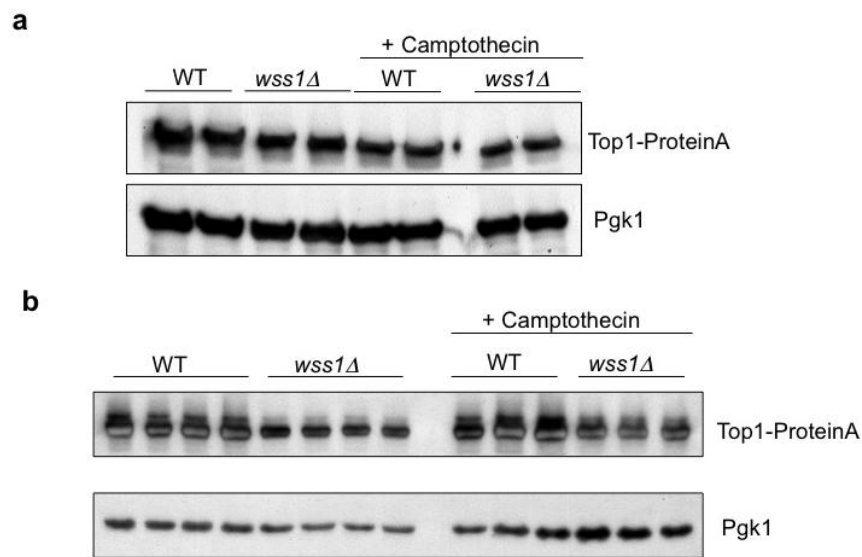


Abb. 28: Top1 Proteinmenge mit und ohne Camptothecin-Behandlung.

a. WT- bzw. $\Delta wss1$ -Stämme mit ProteinA-markiertem *TOP1* wurden bis zur logarithmischen Phase mit bzw. ohne 90-minütiger Zugabe von 50 $\mu\text{g/ml}$ Camptothecin angezogen. Von gleichen Mengen an Zellen wurden denaturierende Proteinextrakte hergestellt und Top1 im Immunblot spezifisch mit anti-ProteinA-Antikörpern analysiert. **b.** wie in (a.), zudem überexprimierten die angegebenen Stämme His-SUMO.

Teilweise lassen unterschiedliche Proteinmengen eines Proteins in verschiedenen Stammhintergründen bereits auf einen schnelleren oder verlangsamten Abbau des Proteins schließen. In Übereinstimmung mit der geringeren Top1-Proteinmenge in $\Delta wss1$ konnte auch in einem *CHX chase*-Experiment ein schnellerer Abbau von Top1 im $\Delta wss1$ -Hintergrund nachgewiesen werden (**Abb. 29**).

Die genetischen Daten sprechen dafür, dass die geringere Top1-Proteinmenge in $\Delta wss1$ auch der Grund für die Suppression des $\Delta ulp2$ *ts*-Phänotyps durch *WSS1*-Deletion sein könnte. Daher wurde Top1 auch in diesem Zusammenhang untersucht. Eine *ULP2*-Deletion führte wie zu erwarten zu einem starkem Anstieg an höher migrierenden Formen von Top1, die höchstwahrscheinlich die polySUMOylierte Form von Top1 darstellen. Deletiert man *WSS1* im $\Delta ulp2$ -Stammhintergrund so unterdrückt man die Akkumulierung dieser Top1-Formen, was die Suppression des *ULP2*-Phänotyps durch die *WSS1* Deletion erklären könnte. Nachdem diese Suppression genetisch von *SLX5* und *SLX8* abhängt, ist anzunehmen, dass SUMOyliertes Top1 Ubiquitin-abhängig abgebaut wird.

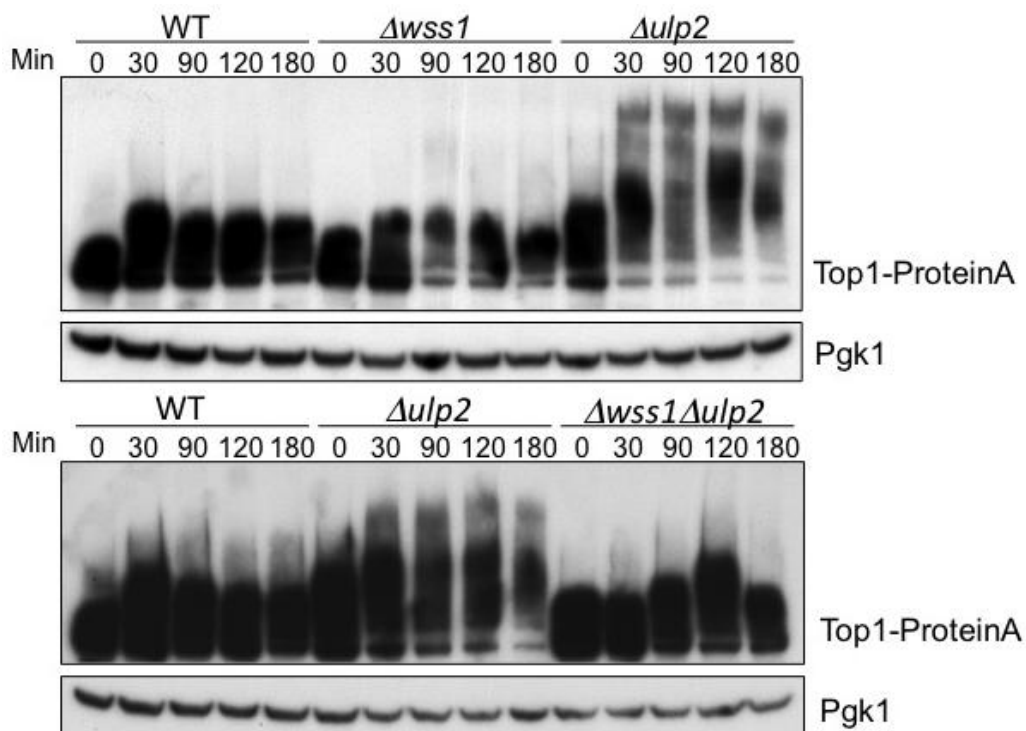


Abb. 29: Analyse der Proteinstabilität von Top1.

Promotor *shut-off* Experiment von ProteinA-markierter Top1 in den angegebenen Stämmen. Zellen wurden bis zur logarithmischen Phase angezogen, CHX zugegeben und zu bestimmten Zeitpunkten Aliquots genommen. Top1 wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung im Immunblot analysiert.

Fasst man alle Daten zusammen, wie die Unterdrückung der höher migrierenden Formen von Top1 durch Deletion von *WSS1* in $\Delta ulp2$ bzw. die geringere Top1-Proteinmenge und der schnellere Abbau von SUMOyliertem Top1 in $\Delta wss1$, so lässt sich vermuten, dass Top1 polySUMOyliert ist und Slx5-abhängig abgebaut wird.

2.4.6 Wss1 schneidet Top1 *in vitro*

Eine plausible Erklärung für die reduzierte Top1-Proteinmenge in $\Delta wss1$ könnte sein, dass Wss1 ein neues deSUMOylierendes Enzym darstellt und SUMO direkt vom Substrat abschneidet. Eine *WSS1*-Deletion würde daher bei Proteinen, bei denen speziell die SUMOylierte Form abgebaut wird, zu einer Reduktion der Proteinmenge insgesamt führen, wie es z.B. für Top1 in $\Delta wss1$ der Fall ist.

Um zu untersuchen, ob Wss1 ein neues deSUMOylierendes Enzym darstellt, wurde getestet, ob rekombinantes Wss1 SUMO von einem SUMO-GST-

Fusionsprotein abschneiden kann. Dazu wurden Glutathion-*beads* (*beads*) mit SUMO^{GG}-GST bzw. als Negativkontrolle mit einer SUMO-Variante (SUMO^{AA}-GST), bei der die C-terminalen Glycinreste durch Alaninreste substituiert wurden, gesättigt und mit rekombinantem Wss1 für 3 Stunden inkubiert (**Abb. 30a**). Durch die Substitution der C-terminalen Glycinreste in SUMO kann ein Abschneiden von SUMO vom SUMO-GST-Fusionsprotein durch deSUMOylierende Enzyme verhindert werden. Um eine mögliche Aktivität der Metalloprotease Wss1 zu unterbinden wurde zudem als Kontrolle EDTA zugegeben. Als Positivkontrolle für den deSUMOylierungsansatz wurde das deSUMOylierende Enzym Ulp1 verwendet. Wie nach gelelektrophoretischer Auftrennung und anschließender Coomassie-Färbung sichtbar wird, kann Wss1 allerdings keines der beiden SUMO-Proteine schneiden. So konnte kein freies SUMO nachgewiesen werden. Bei der scheinbar nach Wss1-Zugabe auftretenden GST-Bande handelt es sich um Degradationsfragmente von Wss1. Die Positivkontrolle Ulp1 hingegen ist in der Lage SUMO^{GG}-GST spezifisch zu schneiden. SUMO^{AA}-GST konnte wie erwartet von Ulp1 nicht geschnitten werden.

Zusätzlich wurden auch polySUMOylierte Proteine mit Hilfe des SIMs von Fir1 aus einem $\Delta wss1 \Delta ulp2$ -Stamm aufgereinigt. Bei Fir1 handelt es sich um ein SUMO-bindendes Protein mit einer starken Affinität zu SUMO, sodass mono- und polySUMOylierte Proteine aus Hefelysaten spezifisch aufgereinigt werden können. Im Gegensatz zu Ulp1 konnte nach Zugabe von Wss1 allerdings keine deSUMOylierung der SUMOylierten Proteine festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Somit konnten keine Hinweise dafür gefunden werden, dass Wss1 deSUMOylierende Aktivität besitzt.

Allerdings könnte auch eine mögliche deubiquitylierende Aktivität den schnelleren Abbau von SUMOyliertem Top1 in $\Delta wss1$ erklären. Um dies zu testen wurden K48- bzw. K63-Polyubiquitinketten sowie ein Ubiquitin-GST-Fusionsprotein mit Wss1 inkubiert. Allerdings konnte in keinem dieser Ansätze Hinweise für eine deubiquitylierende Aktivität von Wss1 gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

Nachdem $\Delta wss1$ durch mehrere Ergebnisse in Verbindung mit toxischen Top1-DNA-Addukten gebracht wurde, wurde untersucht, ob Top1 ein Substrat für die putative proteolytische Aktivität von Wss1 sein könnte und ob Wss1 überhaupt eine funktionale Protease darstellt. Dazu wurde N-Terminal HA-markiertes Top1 aus

Hefelysat, unter stringenten Bedingungen (700mM NaCl, 0,5% Triton-X-100), mit anti-HA-*beads* aufgereinigt und mit rekombinantem Wss1 für 60 Minuten bei 30°C inkubiert. Dabei stellte sich heraus, dass Wss1 in der Lage ist Top1 (siehe *beads*) mehrfach zu schneiden (**Abb. 30b**). Inkubierte man Top1 für längere Zeit mit Wss1, so wurde Top1 komplett degradiert (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt abhängig von der Zink-Bindung von Wss1 ist, da eine EDTA-Zugabe die proteolytische Aktivität von Wss1 inhibieren konnte. Dies ist in Übereinstimmung mit den bioinformatischen Daten, dass es sich bei Wss1 um eine Metalloprotease handelt. Um auszuschließen, dass beim Aufreinigen von Wss1 aus *E.coli* eine aktive Protease mit aufgereinigt wurde und um zu zeigen, dass die Proteasedomäne von Wss1 für die Aktivität essentiell ist, wurde MYC-markiertes Wss1 bzw. die Pd-Variante (Wss1^{H115A}) überexprimiert und aus $\Delta wss1$ -Hefelysaten aufgereinigt sowie anschließend für 60 Minuten mit HA-markierter Top1 inkubiert (**Abb. 30c**). Auch in diesem Ansatz wurde Top1 von Wss1 geschnitten. Die Pd-Wss1-Variante war dazu nicht in der Lage. Interessanterweise zeigte sich zudem, dass sich Wss1 auch selbst schneiden kann (siehe Abschnitt 4.2). Wss1 besitzt daher proteolytische Aktivität und ist in der Lage Top1 *in vitro* zu schneiden. Ob Top1 auch *in vivo* von Wss1 geschnitten wird, muss jedoch noch genauer untersucht werden.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass es starke Hinweise dafür gibt, dass Wss1 proteolytisch auf Top1 wirkt und an der Reparatur von Top1-DNA-Addukten beteiligt ist. In dem Zusammenhang konnte mit Tdp1 ein neuer Kofaktor von Cdc48 identifiziert und beschrieben werden. Zusätzlich wurde gezeigt, dass Tdp1 an SUMOylierte Proteine und das STUBL Slx5 binden kann, was vermuten lässt, dass Tdp1 *in vivo* auf SUMOyliertes Top1 wirkt. Letzteres wird auch durch genetische Interaktionen von Tdp1 mit der SUMO-Kaskade nahe gelegt.

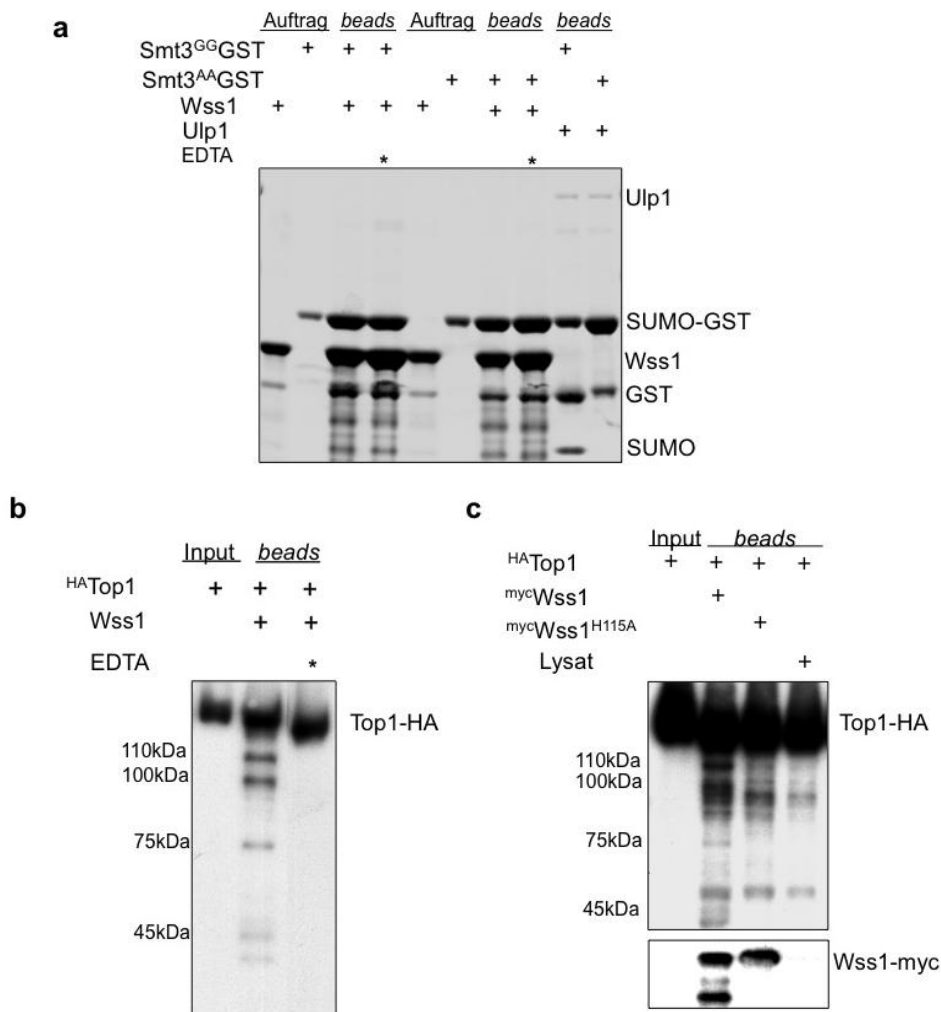


Abb. 30: Wss1 ist eine aktive Protease und schneidet Top1.

a. *beads* gesättigt mit SUMO^{GG}-GST bzw. SUMO^{AA}-GST wurden mit Wss1 bzw. Ulp1 für 3 Stunden bei 30°C inkubiert. Zur Inhibition von Wss1 wurde EDTA zugegeben. Von GST-abgeschnittenes SUMO wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung durch Coomassie-Färbung analysiert. **b.** HA-markiertes Top1 wurde aus Hefelysat mit anti-HA-Antikörpern präzipitiert, mit 700mM NaCl und 0.5% Triton-X-100 mehrmals stringent gewaschen und für 60 Minuten bei 30°C mit Wss1 inkubiert. An die *beads* gekoppeltes Top1 wurde für 10 Minuten bei 65°C in HU-Puffer erhitzt. Geschnittenes Top1 wurde im Immunblot mit anti-HA-Antikörpern analysiert. **c.** Aufreinigung von HA-markierter Top1 wie unter **(b.)** beschrieben. Die Aufreinigung von Myc-markiertem Wss1 bzw. Wss1^{H115A} erfolgte analog zur Top1 Aufreinigung mit anti-Myc-Antikörpern. Wss1 und Top1 wurden bei 30°C für 60 Minuten zusammen inkubiert und geschnittenes Top1, sowie Wss1 anschließend im Immunblot detektiert.

2.5 Agiert Wss1 auf SUMOyliertes Rad52?

WSS1-Deletionsstämme sind sensitiv gegen verschiedene DNA-schädigende Bedingungen, wie UV-Bestrahlung und HU-Bedingungen. In der Regel wird die HU-Sensitivität eines Deletionsstamms mit einem Defekt beim erneuten Start der

angehaltenen Replikationsmaschinerie interpretiert (O'Neill et al., 2004). So führt eine HU-Behandlung der Zellen zu einer allmählichen Nukleotid-Depletion in der Zelle und somit zu einem Anhalten der Replikationsmaschinerie. Für eine Beteiligung von Wss1 an diesem erneuten Start spricht auch, dass Wss1 physisch mit Psy2 und Tof1 interagiert, die beide an der Stabilisierung der Replikationsgabel beteiligt sind. Um die Funktion von Wss1 aufzuklären und um herauszufinden, ob *WSS1* epistatisch zu einem bestimmten Reparaturweg ist, wurde *WSS1* in $\Delta rad6$ - bzw. $\Delta rad18$ - (defekter postreplikativer Prozess), $\Delta rad14$ - (defekte Nukleotid Exzisionsreparatur) bzw. $\Delta rad51$ - und $\Delta rad52$ - (defekte homologe Rekombination) Hefestämmen deletiert. Anschließend wurde untersucht, ob die Doppeldeletionen unter HU- bzw. UV-Bedingungen epistatisch sind. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine *WSS1*-Deletion in all diesen Stammhintergründen zu synthetischen Wachstumsbedingungen unter HU- und UV-Bedingungen führt und Wss1 somit scheinbar an mehreren Reparaturwegen beteiligt ist (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass eine $\Delta rad52 \Delta wss1$ -Doppeldeletion im Gegensatz zu den Einzelmутanten einen leichten Wachstumsdefekt besitzt (**Abb. 31a**).

Interessanterweise wird Rad52 nach der Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen SUMOyliert (Sacher et al., 2006). So kann durch Zugabe von Zeozin, was zu DNA-Doppelstrangbrüchen in der Zelle führt, die SUMOylierung von Rad52 induziert werden. Man nimmt daher an, dass das am Rekombinationsprozess beteiligte Rad52-Protein SUMOyliert ist. Auch Gendelektionen die einen sogenannten pro-rekombinatorischen Phänotyp, d.h. eine erhöhte Rekombinationsrate, besitzen, weisen eine erhöhte Rad52-SUMOylierung auf. Interessanterweise besitzt auch eine *WSS1*-Deletion einen solchen Phänotyp (Alvaro et al., 2007). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob auch $\Delta wss1$ einen erhöhten Anteil an SUMOyliertem Rad52 aufweist. Um dies zu zeigen wurde His-markiertes SUMO durch Ni-NTA-Chromatographie aus WT- bzw. $\Delta wss1$ -Hefestämmen denaturierend aufgereinigt und endogenes Rad52 immundetektiert (**Abb. 31b**). Es zeigte sich, dass in $\Delta wss1$ -Stämmen der Anteil an SUMOyliertem Rad52 in der Tat erhöht ist. Interessanterweise führt die Deletion von *WSS1* auch zu einer erhöhten Anzahl an Rad52-Foci, die zudem länger persistieren (Steven Bergink, persönliche Mitteilung).

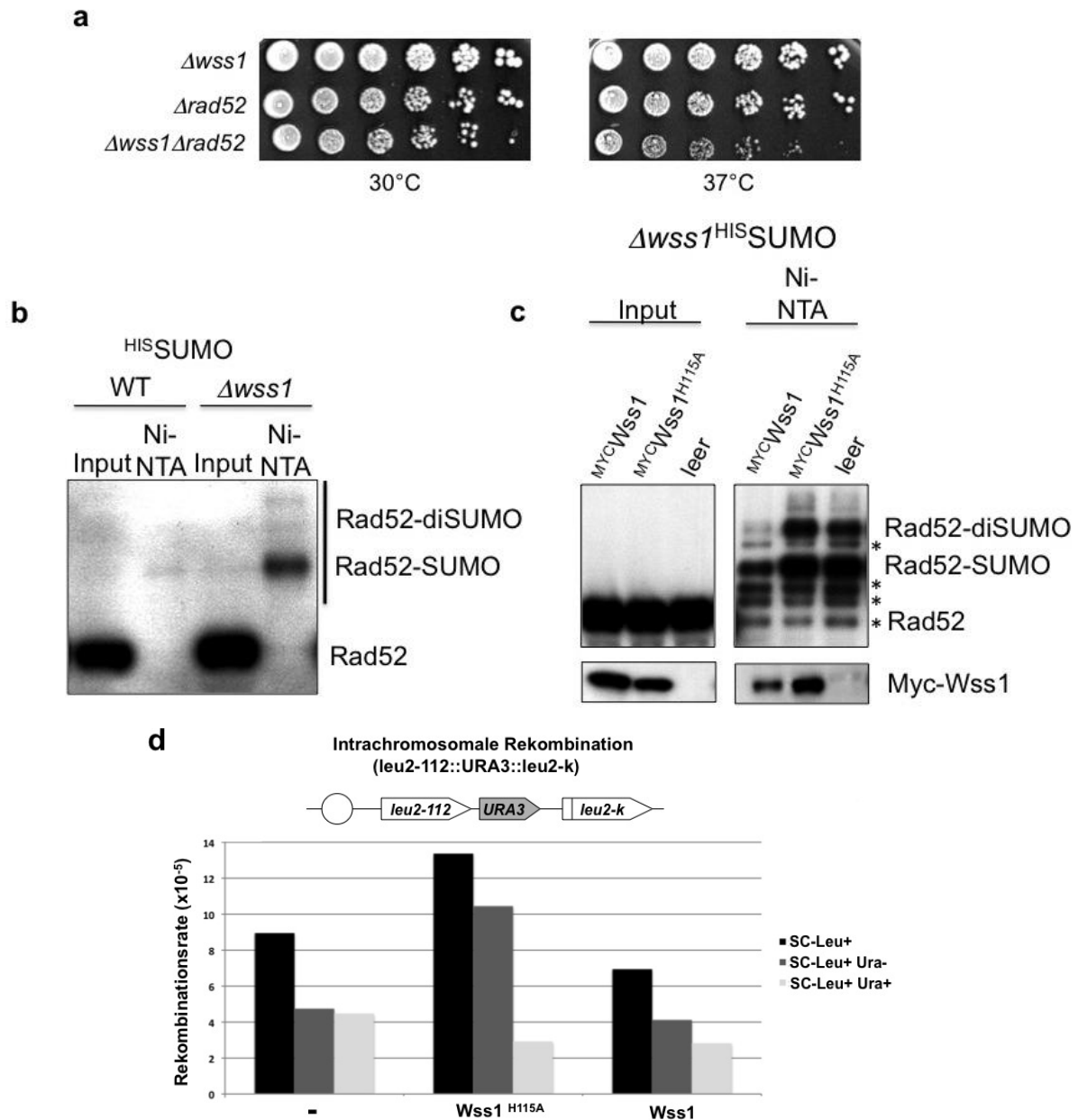


Abb. 31: Analyse von Rad52 in $\Delta wss1$.

a. Serielle Verdünnungen von WT, $\Delta wss1$, $\Delta rad52$ bzw. $\Delta wss1 \Delta rad52$ wurden auf SC-Platten ausgebracht und für 3 Tage bei 30°C bzw. 37°C inkubiert. **b.** Durch denaturierende Ni-NTA Chromatographie wurden SUMOylierte Proteine aus WT bzw. $\Delta wss1$ -Hefestämmen, die His-SUMO überexprimierten, aufgereinigt. SUMOyliertes Rad52 wurde im Immunblot analysiert. Der Input zeigt 1% der eingesetzten Menge. **c.** Experimentelle Durchführung wie in (b.). Als Stammhintergrund diente $\Delta wss1$, der His-SUMO sowie Wss1, Wss1^{H115A} bzw. einen Leervektor überexprimierte. Die SUMOylierung von Rad52 wurde im Immunblot spezifisch nachgewiesen. Die Sternchen kennzeichnen kreuzreaktive Banden. **d.** Intrachromosomale Rekombination zwischen zwei gleich orientierten nicht funktionalen LEU2-Allelen (*direct repeat assay*). Rekombinationereignisse (Sc-Leu+) können zu Gendeletionen (SC-Leu+ Ura-) oder Genkonversionen (SC-Leu+ Ura+) führen und erlauben Wachstum auf den angegebenen SC-Platten. Mit Hilfe einer Fluktuationsanalyse wurden die Rekombinationsraten bestimmt. Dargestellt ist der Einfluß der Überexpression von Wss1 bzw. der Wss1 Pd-Variante auf die Rekombinationsrate. Als Kontrolle diente die Expression eines Leervektors (-) ohne ORF.

Wie bereits erwähnt, werden Doppelstrangbrüche, die durch kovalent verknüpfte Top1 DNA-Addukte verursacht wurden, über den Rad52-abhängigen Weg der homologen Rekombination repariert. Eine *RAD52*-Deletion ist daher extrem Camptothecin sensitiv. Die erhöhte SUMOylierung von Rad52 in $\Delta wss1$ ist allerdings nicht auf die Reparatur von Top1-DNA-Addukten zurückzuführen, da eine *TOP1*-Deletion in $\Delta wss1$ zu keiner Reduktion von SUMOyliertem Rad52 führt (Daten nicht gezeigt).

Der erhöhte Anteil an SUMOyliertem Rad52 im $\Delta wss1$ -Hintergrund könnte auch dahingehend interpretiert werden, dass SUMOyliertes Rad52 ein Substrat für Wss1 darstellt und dessen Anteil daher in $\Delta wss1$ erhöht ist. Eine Wss1-Überexpression sollte somit spezifisch zu einer Reduktion der SUMOylierten Form von Rad52 führen. In der Tat zeigte sich, dass die Überexpression von Wss1 zu einer Reduktion von SUMOyliertem Rad52 führt (**Abb. 31c**). Die Überexpression der Pd-Variante von Wss1 (Wss1^{H115A}) hingegen hatte keinen Einfluß auf SUMOyliertes Rad52, sondern führte sogar zu einer leicht verstärkten Rad52-SUMOylierung. Dieser Effekt der Wss1-Überexpression bzw. *WSS1*-Deletion ist scheinbar spezifisch für SUMOyliertes Rad52, da sich die SUMO- bzw. Ubiquitylierung von PCNA bzw. Pgk1 nicht ändert (Daten nicht gezeigt). PCNA wird u.a. abhängig vom Zellzyklus bzw. als Folge von DNA-Schäden SUMO- und Ubiquityliert (Hoege et al., 2002). Damit kann auch ein zellzyklusspezifischer Effekt der Wss1-Überexpression bzw. der *WSS1*-Deletion ausgeschlossen werden. Neben der Modifikation mit SUMO wird Rad52 auch mit Ubiquitin modifiziert. Die Ubiquitylierung von Rad52 änderte sich allerdings weder in einem *WSS1*-Deletionshintergrund noch bei Überexpression von WT-Wss1 oder der Pd-Variante (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse legen nahe, dass Wss1 proteolytisch spezifisch auf SUMOyliertes Rad52 wirken könnte. Ob es dabei SUMO von SUMO-Rad52 abschneidet oder aber SUMO bzw. das Rad52-Protein zerschneidet ist unklar.

Nachdem die Überexpression von Wss1 bzw. der Pd-Variante die SUMOylierung von Rad52 beeinflusst, wurde untersucht, ob Wss1 auch einen Einfluß auf die Funktion von Rad52 hat. Für die SUMOylierungsdefiziente Variante von Rad52 (*rad52KKK*) wurde bereits gezeigt, dass diese eine geringere intrachromosomale Rekombinationsrate als WT Rad52 aufweist und die

SUMOylierung von Rad52 daher vermutlich pro-rekombinatorisch wirkt (Sacher et al., 2006). Aus diesem Grund wurde die Überexpression von Wss1 im selben Hefestamm untersucht in dem auch die SUMOylierungsdefiziente-Variante von Rad52 analysiert wurde (**Abb. 31d**). In diesem Testsystem (*direct repeat-system*) liegen zwei gleich orientierte nicht funktionale *LEU2*-Heteroallele (*leu2-112*; *leu2-k*), durch ein funktionales *URA3*-Allel voneinander getrennt, hintereinander auf einem DNA-Strang. Rekombinationsereignisse zwischen den *LEU2*-Heteroallelen führen dazu, dass das *LEU2*-Allel wieder funktional ist und der Stamm somit auf SC-Leu-Platten wachsen kann. Das besondere an diesem Hefestamm ist ferner, dass hierbei neben der Gesamtrekombinationsrate (Leu⁺-Zellen, schwarz) zusätzlich auch Genkonversionen (Leu⁺ Ura⁺-Ereignisse, hellgrau) und Gendeletionen (Leu⁺ Ura⁻-Ereignisse, dunkelgrau) dargestellt werden können. Interessanterweise führt die Überexpression von Wss1 in diesem Testsystem zu einer reduzierten Rekombinationsrate, ähnlich wie dies bereits für eine *rad52KKK*-Variante gezeigt wurde (siehe Abnahme der Leu⁺-Zellen, schwarz; **Abb. 31d**; Sacher et al., 2006). Im Gegensatz zur Expression der *rad52KKK*-Variante kommt es aber bei Wss1-Überexpression nicht zu einer Abnahme an Gendeletionensereignissen (Leu⁺ Ura⁻-Ereignisse, dunkelgrau). Die Überexpression der Wss1 Pd-Variante führte beachtenswerterweise zu einem pro-rekombinatorischem Phänotyp (siehe Zunahme der Leu⁺-Zellen, schwarz; **Abb. 31d**) und einer deutlichen Zunahme an Gendeletionensereignissen (Leu⁺ Ura⁻-Ereignisse, dunkelgrau). Dies ist in Übereinstimmung mit der Interpretation, dass die SUMOylierung von Rad52 pro-rekombinatorisch wirken könnte, da in Wss1-Pd-Überexpressionsstämmen auch die SUMOylierung von Rad52 erhöht ist.

Auf andere Rad52-abhängige Rekombinationsprozesse, wie *single strand annealing* oder interchromosomale Rekombination, bei denen die SUMOylierung von Rad52 scheinbar keine Funktion besitzt, hatte die Überexpression von Wss1 keinen Einfluß. Wss1 scheint daher ganz bestimmte Rad52-abhängige Rekombinationsprozesse zu beeinflussen, die über die SUMOylierung von Rad52 reguliert werden.

Nachdem Wss1 *in vivo* scheinbar direkt auf SUMOyliertes Rad52 wirkt, wurde untersucht, ob beide Proteine auch physisch miteinander interagieren können.

Allerdings konnte dies durch Immunpräzipitationsversuche nicht reproduzierbar bestätigt werden. Dies ist höchstwahrscheinlich auf die sehr transiente Interaktion zurückzuführen. Eine Methode, wie man die Interaktion stabilisieren kann, ist durch Überexpression von Wss1 bzw. die Verwendung einer trunkierten Version, in der die Protease-Domäne fehlt. So konnte im Y2H-Experiment gezeigt werden, dass eine trunkierte Version von Wss1 ($Wss1^{\Delta 1-163}$) mit Rad52 interagieren kann (**Abb. 32a**). Diese Bindung ist interessanterweise abhängig von SUMO. So können beide Proteine nicht mehr miteinander interagieren, wenn man entweder das SIM von Wss1 deletiert ($Wss1^{\Delta 1-163 \text{ SIM}}$) oder aber die Lysinreste (K10, K11, K220) an denen Rad52 SUMOyliert wird (Rad52KKK) substituiert.

Als Positivkontrolle für die Expression der SIM-Variante von Wss1 dient die SIM-unabhängige Wss1-Interaktion mit der Ubiquitinligase Rad18 bzw. die nur verminderte Interaktion der SIM-Variante mit Rad51. Mit dem Ubiquitin-E2 Rad6 konnte hingegen keine Interaktion nachgewiesen werden.

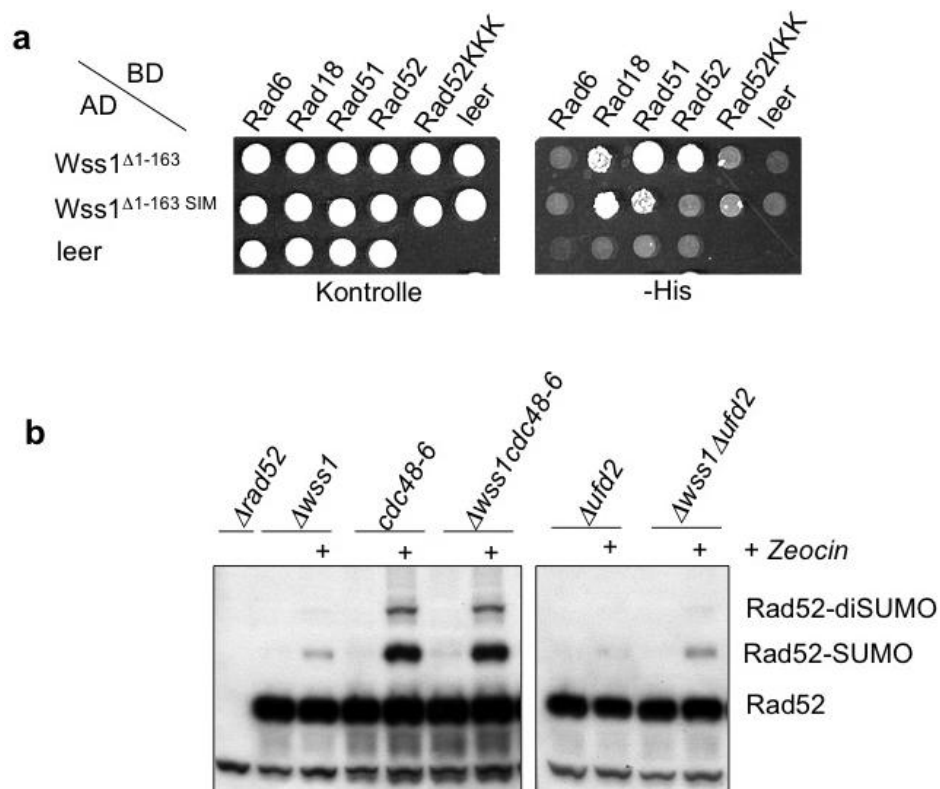


Abb. 32: Wss1 interagiert mit SUMOyliertem Rad52; SUMOylierung von Rad52 in *cdc48-6*, $\Delta ufd2$ und Doppelmutanten mit $\Delta wss1$.

a. In einem Hefe-Zwei Hybrid Experiment interagieren Wss1 und Rad52 abhängig von der SUMOylierung von Rad52 bzw. dem SIM von Wss1. **b.** Rad52-SUMOylierungsphänotyp in *cdc48-6*, $\Delta ufd2$ und den Doppeldeletionsmutanten mit $\Delta wss1$. Zeocin-Zugabe: 0,02%.

Ob Wss1 auf SUMOyliertes Rad52 direkt agiert, muss jedoch noch genauer untersucht werden. Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang allerdings, dass SUMOyliertes Rad52 *in vivo* physisch mit Cdc48 interagiert (Steven Bergink, persönliche Mitteilung) und *cdc48-6* ebenso wie $\Delta wss1$ einen erhöhten Anteil an SUMOyliertem Rad52 aufweist. Eine Deletion von *WSS1* im *cdc48-6*-Stammhintergrund führte jedoch zu keinem erhöhten Anteil an SUMOyliertem Rad52, was dafür spricht, dass beide Proteine im selben Prozess agieren könnten (**Abb. 32b**). In zwei verschiedenen Prozesswegen scheinen hingegen *UFD2* und *WSS1* zu agieren, da eine Doppeldeletion beider Gene zu einem additiven Phänotyp führt. Dafür spricht auch, dass die Doppeldeletion $\Delta wss1\Delta ufd2$ Zeozin-sensitiv ist, wohingegen beide Einzeldelationen nur eine äußerst geringe Sensitivität besitzen (Daten nicht gezeigt).

Meik Sacher konnte zeigen, dass am Rekombinationsprozess beteiligtes Rad52 SUMOyliert ist und die SUMOylierung von Rad52 eventuell zur Stabilität des Rad52-Proteins beitragen könnte (Sacher et al., 2006). In dieser Arbeit wurde nun Hinweise dafür gefunden, dass die SUMOylierung allerdings auch beim Abbau von Rad52 eine Rolle spielen könnte. So scheint die Protease Wss1, zusammen mit Cdc48, proteolytisch spezifisch auf die SUMOylierte Form von Rad52 zu wirken und Rad52 damit zu inaktivieren.

2.6 Ist Cdc48 am SUMO-abhängigen Protein-Abbau involviert?

Nachdem Wss1 mehrere genetische und physische Verbindungen zum SUMO-abhängigen Protein-Abbau besitzt lag es nahe zu testen, ob auch Cdc48 an diesem Prozess involviert ist. Hefemutanten von Proteinen, die an diesem Prozess beteiligt sind, akkumulieren polySUMOylierte Proteine, die im *stacking gel* nachweisbar sind (Uzunova et al., 2007).

In diesem Zusammenhang wurden die Zelllysate von *cdc48-6*, *ufd1-2*, $\Delta shp1$ und $\Delta ufd2$ auf die Akkumulation von SUMOylierten Proteinen untersucht. Interessanterweise lassen sich dabei sowohl im *cdc48-6*- als auch im *ufd1-2*-Hintergrund verstärkt polySUMOylierte Proteine nachweisen (**Abb. 33a**).

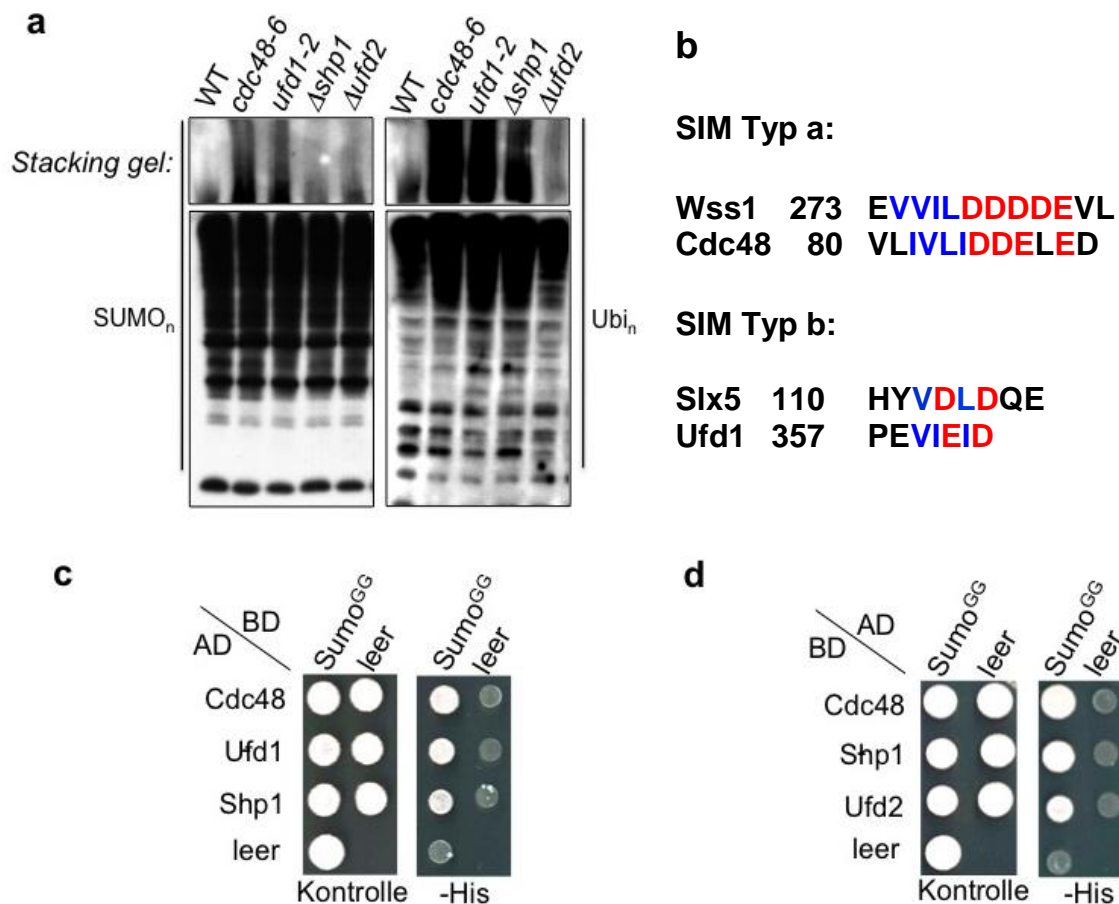


Abb. 33: Analyse der SUMO-Interaktion von Cdc48 und seinen Kofaktoren.

a. Aliquots der angegebenen Stämme wurden auf das SUMOylierungsmuster untersucht. Dazu wurden denaturierende Proteinextrakte hergestellt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und SUMOylierte Proteine im Immunblot analysiert. **b.** Sequenzvergleiche von Cdc48 und Ufd1 zeigen, dass diese SUMO-interagierende Motive besitzen. Darstellung der hydrophoben bzw. sauren Aminosäuren in blau bzw. rot. Die Zahlen entsprechen der Aminosäureposition des SIMs. **c.** Interaktion von Cdc48 und den Kofaktoren Ufd1 bzw. Shp1 mit SUMO im Hefe-Zwei-Hybrid Experiment **d.** Im Y2H-Experiment interagieren zudem Ufd2 und SUMO.

Des Weiteren konnte durch bioinformatische Untersuchungen gezeigt werden, dass Cdc48 und Ufd1 ein SUMO-interagierendes Motiv besitzen (**Abb. 33b**). Interessanterweise liegt das Cdc48-SIM im N-terminalen Bereich an dem auch die Substrat-Bindung stattfindet. Cdc48 und Ufd1 könnten daher SIM-vermittelt direkt mit SUMOylierten Proteinen interagieren. Dies unterstreichend konnte in einem Y2H-Experiment eine Interaktion von Cdc48, Ufd1, Ufd2 sowie Shp1 mit SUMO nachgewiesen werden (**Abb. 33c,d**). Zusätzlich wurde in einem Y2H-Experiment gezeigt, dass Cdc48 in der Tat über die SIM-tragende N-Domäne an SUMO bindet

(Daten nicht gezeigt). Ob Cdc48 *in vivo* nicht-kovalent mit SUMO interagieren kann und ob dies über das putative SIM-vermittelt wird, muss jedoch noch genauer untersucht werden.

Analog zur Kofaktor-vermittelten Interaktion mit ubiquitylierten Proteinen könnte Cdc48 *in vivo* auch mit SUMOylierten Proteinen über Kofaktoren-vermittelt interagieren. Nachdem die *cdc48-6*-Mutante eine ähnliche Akkumulierung an polySUMOylierten Proteinen aufwies wie eine *SLX5*-Deletion, wurde untersucht, ob Cdc48 mit Slx5 auch physisch interagieren kann. Diese Interaktion konnte in einem Y2H-Experiment dargestellt werden (**Abb. 34a**). Auch genetisch scheinen *SLX5* und *CDC48* verbunden zu sein, da eine Deletion von *SLX5* in Kombination mit Mutanten von Cdc48-Kofaktoren, wie *ufd1-2*, Δ *shp1* bzw. Δ *ufd2* zu additiven Wachstumsdefekten führt (**Abb. 34b**).

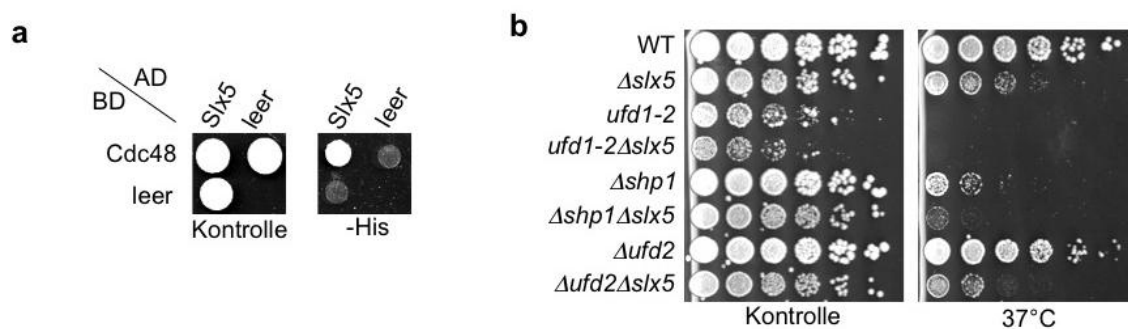


Abb. 34: Cdc48 interagiert physisch und genetisch mit Slx5 bzw. *SLX5*.

a. Darstellung der Slx5-Cdc48 Interaktion im Y2H-Experiment. **B.** Genetische Analyse von Cdc48 und Kofaktoren mit *SLX5*. Gleiche Anzahl an Zellen wurden in 5-facher Verdünnung auf SC-Platten ausgebracht und für 3 Tage bei den angegebenen Temperaturen inkubiert.

Im Rahmen der Untersuchung der SUMO-Mutante *smt3-331* wurde ein artifizielles SUMO-Fusionsprotein, *smt3-331*-Pro- β -Gal, hergestellt, um, analog zum UFD-Substrat Ubi-Pro- β -Gal, den Abbau dieser SUMO-Variante zu untersuchen. Dabei wurde interessanterweise festgestellt, dass das SUMO-Fusionsprotein in Δ *wss1* instabil ist (**Abb. 35**). Beachtenswerterweise ist auch das Fusionprotein bestehend aus WT-SUMO und Pro- β -Gal in Δ *wss1* leicht instabil (Daten nicht gezeigt). Dies lässt vermuten, dass *smt3-331* nicht deswegen abgebaut wird, weil es sich um ein falsch gefaltetes Protein handeln könnte, sondern, dass SUMO in der Zelle teilweise generell abgebaut wird. Allerdings ist der Abbau von *smt3-331*-Pro- β -Gal verglichen mit SUMO-Pro- β -Gal stärker, sodass das *smt3-331*-Pro- β -Gal

Fusionsprotein für die weiteren Experimente verwendet wurde. Zudem wurde der $\Delta wss1$ -Stammhintergrund nachfolgend benutzt, um zu sehen, ob der Abbau dieses Fusionsproteins über Cdc48 vermittelt wird. Dazu wurde das smt3-331-Pro- β -Gal-Konstrukt in $\Delta wss1 cdc48-6$ und $\Delta wss1 ufd1-2$ bzw. WT, sowie $cdc48-6$ und $ufd1-2$ als Kontrolle exprimiert und ein CHX chase-Experiment durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass in den Stammhintergründen $\Delta wss1 cdc48-6$ und $\Delta wss1 ufd1-2$ das SUMO-Fusionsprotein stabilisiert wird. Demnach wird das SUMO-Fusionsprotein, ähnlich wie Ubi-Pro- β -Gal, abhängig von Cdc48 und Ufd1 abgebaut.

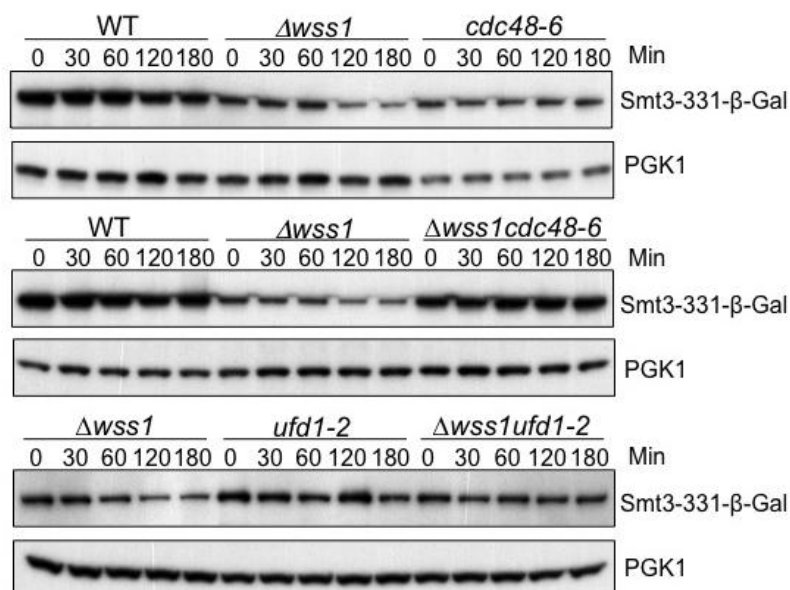


Abb. 35: Einfluß der WSS1-Deletion sowie von $cdc48-6$ und $ufd1-2$ auf den Abbau von Smt3-331-P- β -Gal.

Die Stabilität von Smt3-331-P- β -Gal wurde im CHX chase-Experiment in WT, $\Delta wss1$, $cdc48-6$, $\Delta wss1 cdc48-6$, $ufd1-2$ und $\Delta wss1 ufd1-2$ analysiert. Die angegebenen Stämme wurden bis zur logarithmischen Phase angezogen, für 60 Minuten auf 37°C gegeben und anschließend CHX zugegeben. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots genommen, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch anti- β -Gal-Immunblots analysiert. Als Kontrolle diente die Proteinmenge von Pgc1.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass erste Experimente auf eine direkte Beteiligung von Cdc48 und seinen Kofaktoren, im speziellen Ufd1 und Wss1, am SUMO-abhängigen Protein-Abbau schließen lassen.

2.7 Genetische Interaktion von *WSS1* mit der SUMO-Kaskade

Neben seiner nicht-kovalenten Interaktion mit SUMO interagiert Wss1 auch physisch mit Komponenten der SUMO-Kaskade. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass *WSS1* genetisch mit dem deSUMOylierenden Enzym *ULP2* bzw. den SUMO-abhängigen Ubiquitinligasen *SLX5*, *SLX8* und *RIS1* verbunden ist. So kann eine Deletion, jeweils einer dieser Ubiquitin-Ligasen, den $\Delta ulp2$ $\Delta wss1$ -Phänotyp supprimieren. Zudem konnte für SUMO bzw. SUMOylierte Proteine, wie für *smt3-331* und Top1, bereits gezeigt werden, dass diese in $\Delta wss1$ schneller abgebaut werden. In Übereinstimmung mit der Interpretation dieser Daten, führt eine *WSS1*-Deletion in *smt3-331*-, *ubc9ts*- bzw. einer $\Delta siz1$ $\Delta siz2$ -Mutante zu einem stärkeren Wachstumsdefekt (**Abb. 36** bzw. siehe Abb. 22). Diese Stämme weisen alle einen geringen Anteil an SUMOylierten Proteinen auf, sodass ein vermutlich schnellerer Abbau von SUMOylierten Proteinen das Wachstum dieser Stämme zusätzlich beeinträchtigen könnte. Um den Einfluß der *WSS1*-Deletion auf den Anteil an SUMOylierten Proteine zu zeigen wurde His-Epitop markiertes SUMO aus *ubc9ts*- bzw. *smt3-331*-Stämmen durch Ni-NTA-Chromatographie denaturierend aufgereinigt und SUMOylierte und ubiquitylierte Proteine im Western Blot spezifisch nachgewiesen (**Abb. 36b,c**). Interessanterweise konnten in $\Delta wss1$ -Doppelmutanten, verglichen mit dem jeweiligen Einzelmутanten-Hintergrund, mehr ubiquitylierte SUMOylierte Proteine nachgewiesen werden, obwohl weniger SUMOylierte Proteine präzipitiert wurden. Dies stimmt mit dem Model überein, dass Wss1 auf ubiquitylierte SUMOylierte Substrate proteolytisch agiert und diese Proteine schneidet.

Aus beiden Experimenten wird zudem ersichtlich, dass eine *WSS1*-Deletion zu einer Reduktion an SUMOylierten Proteinen führt. Dies könnte auch die genetischen Verbindungen mit Komponenten der SUMO-Kaskade und den Ubiquitinligasen *SLX5*, *SLX8* erklären.

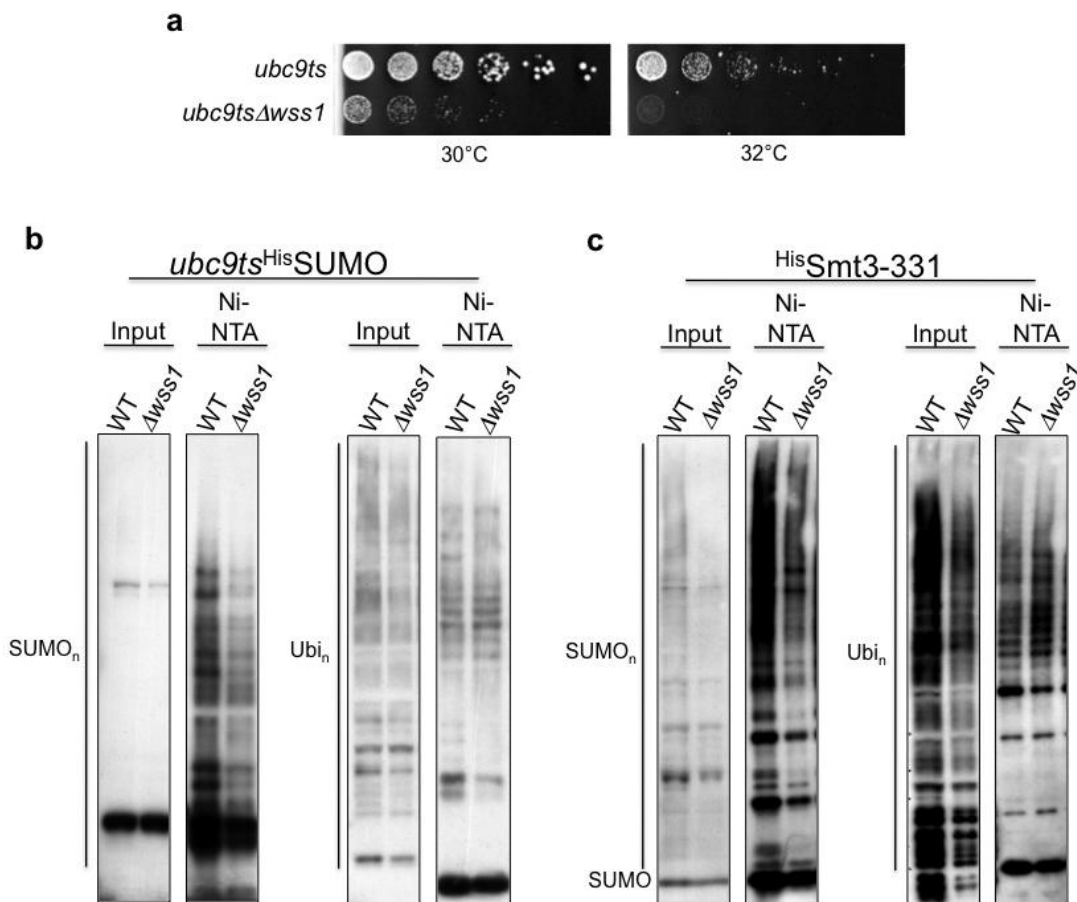


Abb. 36: Einfluß der WSS1-Deletion auf die Anzahl an SUMOylierten Proteinen.

a. Serielle Verdünnungsreihe von *ubc9ts* und Δ wss1 *ubc9ts*. Die Stämme wurden auf SC-Platten ausgebracht und für 3 Tage bei 30°C bzw. 32°C inkubiert. **b.** Ni-NTA Chromatographie aus *ubc9ts*, Δ wss1 *ubc9ts*, die His-SUMO überexprimieren. SUMOylierte bzw. ubiquitylierte Proteine wurden im Immunblot nachgewiesen. **c.** Versuch wie unter (b.) beschrieben mit *smt3-331* bzw. Δ wss1 *smt3-331*-Stämmen.

2.8 Mögliche Regulation von Wss1

Da die Folge der Aktivität von Proteasen in der Regel irreversibel ist wird die Aktivität von Proteasen normalerweise streng reguliert. So werden Proteasen in der Zelle u.a. als Vorläuferproteine, als sogenannte Zymogene, synthetisiert. Diese inaktiven Vorläuferproteine müssen zur Aktivierung der Protease zuerst prozessiert werden. Auch eine Kofaktor-vermittelte Bindung an das Substrat bzw. eine Organellen-spezifische Aktivität, wie z.B. die von Mitochondrien-spezifischen Proteasen, kann zur Spezifität und regulierten Aktivität der Protease beitragen.

All dies stellt sicher, dass Proteasen nur dort und dann aktiv sind, wo und wann es erforderlich ist. Verschiedene Ergebnisse deuten daraufhin, dass auch die Protease Wss1 reguliert wird.

2.8.1 Wss1 schneidet sich selbst

Im vorigen Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Wss1 abhängig von seiner Proteasefunktion *in vitro* Top1 schneiden kann. Im selben Versuch ist auch ersichtlich, dass nur die aktive Protease trunkierte Formen von Myc-markiertem Wss1 aufweist (siehe Abb. 30c). Um zu testen ob Wss1 sich selbst schneiden kann, wurde rekombinantes Wss1 bei 30°C inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten Proben genommen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Wie in der Coomassie-Färbung sichtbar wird, kann Wss1 sich *in vitro* selber schneiden (**Abb. 37a**).

Um zwischen einem Schneiden *in cis* und *in trans* zu unterscheiden wurde die Pd-Variante (^{Myc}WSS1^{H115A}) aus $\Delta wss1$ aufgereinigt und für 2 Stunden mit rekombinantem Wss1 bei 30°C inkubiert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung und spezifischer Immundetektion von ^{Myc}Wss1^{H115A} zeigt sich, dass sich Wss1 *in trans* schneiden kann. So wird die Pd-Variante ^{Myc}Wss1^{H115A} abhängig von der Zugabe von aktivem rekombinantem Wss1 geschnitten (**Abb. 37b**). Interessanterweise wird dabei der C-Terminale Bereich von Wss1 abgeschnitten, der das SIM aufweist. Um zu testen, ob Wss1 sich auch *in vivo* schneidet wurde MYC-markiertes Wss1 (^{Myc}Wss1) bzw. die Pd-Variante (^{Myc}Wss1^{H115A}) in WT bzw. $\Delta wss1$ exprimiert und per Immunblot analysiert. In Übereinstimmung mit den *in vitro*-Daten konnten nur im WT-Hintergrund Wss1-spezifische N-terminale Fragmente nachgewiesen werden. In $\Delta wss1$ war dies nur für Wss1-WT der Fall, was bestätigt, dass Wss1 hauptsächlich von Wss1 selbst geschnitten wird (**Abb. 37c**).

WT-Hintergrund (**Abb. 37d**). Eine mögliche Interpretation ist, dass im WT-Hintergrund die Pd-Variante ($^{Myc}Wss1^{H115A}$) von Wss1-WT geschnitten und damit das SIM abgeschnitten wird. Dies könnte die Interaktion mit SUMOylierten Proteinen (den putativen Wss1-Substraten) destabilisieren, da diese Interaktion durch das SIM stabilisiert wird.

2.8.2 Regulatorische Funktion der Wss1 SUMOylierung?

2.8.2.1 Wss1 wird SUMOyliert

Eine andere mögliche Art der Regulierung von Wss1 ist die über SUMOylierung. So bindet Wss1 an das SUMO-E2 Ubc9 und die SUMO-Ligase Siz2, was nahe legt, dass auch Wss1 SUMOyliert werden könnte. Um daher zu überprüfen, ob auch Wss1 selbst ein SUMO-Substrat darstellt, wurde His-Epitop markiertes SUMO denaturierend aufgereinigt und Wss1 bzw. die Wss1-Varianten immundetektiert.

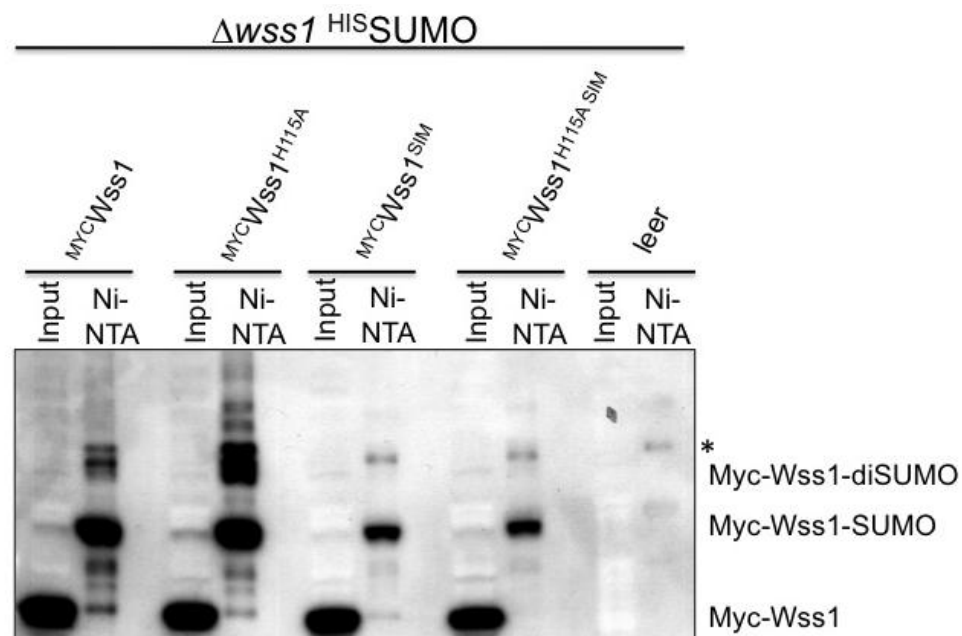


Abb. 38: Wss1 ist ein SUMO-Substrat.

Myc-markiertes Wss1 bzw. die angegebenen Wss1-Varianten wurden aus $\Delta wss1$ -Zellen, die $^{His}SUMO$ überexprimieren, denaturierend über Ni-NTA Chromatographie aufgereinigt. SUMOyliertes Wss1 wurde im Immunblot mit anti-Myc Antikörpern nachgewiesen. Das Sternchen markiert eine kreuzreaktive Bande.

Wie bereits vermutet, wird Wss1 SUMOyliert (**Abb. 38**). Dabei wird ersichtlich, dass die diSUMOylierung von Wss1 von der nicht-kovalenten Interaktion mit SUMO abhängt, da eine SIM-Deletion ($^{Myc}WSS1^{SIM}$) zum Verlust der diSUMOylierung führt. Dass die SIM-Variante trotz Verlust der Y2H-Interaktion mit SUMO bzw. Ubc9 immer noch SUMOyliert wird bestätigt den Befund, dass diese Variante im Y2H-Experiment immer noch mit Siz2 interagieren kann (siehe Abschnitt 2.1.2). Ob Siz2 für die SUMOylierung von Wss1 verantwortlich ist bleibt dennoch unklar. Interessanterweise wird die Pd-Variante ($^{Myc}WSS1^{H115A}$) stärker SUMOyliert, was wiederum durch die Deletion des SIMs von Wss1 supprimiert werden kann.

2.8.2.2 Wss1 scheint SUMO-abhängig über Slx5 abgebaut zu werden

Wss1 zeigt genetische und physische Verbindungen zum SUMO-abhängigen Abbauweg von Proteinen und wird auch selbst SUMOyliert. Somit könnte auch Wss1 über diesen Abbauweg reguliert werden. Aus diesem Grund wurde die Halbwertszeit von Wss1 und Wss1-Varianten in einem *CHX chase*-Experiment untersucht. In der Tat zeigte sich, dass Wss1 abhängig von der SUMOylierung unterschiedlich stark abgebaut wird. So führte sowohl eine Reduktion ($^{Myc}Wss1^{SIM}$) als auch eine Erhöhung der Wss1-SUMOylierung ($^{Myc}Wss1^{H115A}$) zu einem schnelleren Abbau (**Abb. 39b**). Ein Protein, das zum Abbau der SUMOylierten Form von Wss1 beitragen könnte ist die SUMO-spezifische Ubiquitinligase Slx5 mit der Wss1 interagiert. Aus diesem Grund wurde *SLX5* in einem $\Delta wss1$ -Stamm der His SUMO überexprimiert deletiert und SUMOyliertes Wss1 bzw. die SUMOylierte Pd-Variante denaturierend aufgereinigt. Neben einem erhöhten Anteil an SUMOyliertem Rad52, das als Kontrolle für die erfolgreiche Deletion von *SLX5* diente, führte eine *SLX5*-Deletion sowohl zu einem Anstieg der Proteinmenge der Pd-Variante (vergleiche Inputmenge von $^{Myc}WSS1^{H115A}$ in den Stammhintergründen $\Delta wss1$ mit $\Delta wss1 \Delta slx5$) als auch zu einem deutlichen Anstieg der SUMOylierung der Pd-Variante (**Abb. 39a**). Dies deutet darauf hin, dass Slx5 direkt am Abbau von SUMOyliertem Wss1 beteiligt sein könnte. Wenn dies der Fall sein sollte, so müsste eine *SLX5*-Deletion zu einer Stabilisierung der kurzlebigeren Pd-Variante (verglichen mit WT-Wss1) in

einem *CHX chase*-Experiment führen. Interessanterweise zeigte sich, dass eine *SLX5*-Deletion den schnelleren Abbau der Pd-Variante verlangsamen kann (**Abb. 39b**). Keinen Einfluß hat die *SLX5*-Deletion hingegen auf den schnelleren Abbau der SIM-Varianten von Wss1 (^{Myc}Wss1^{SIM} bzw. ^{Myc}Wss1^{H115A SIM}) (**Abb. 39b** bzw. Daten nicht gezeigt). Diese Wss1-Varianten werden nicht mehr di- bzw. polySUMOyliert, was dafür spricht, dass in $\Delta slx5$ ausschließlich der Abbau der di- bzw. polySUMOylierten Form von Wss1 verhindert wird. Die direkte Interaktion von Wss1 und Slx5 (siehe Abb. 13), sowie die Stabilisierung von polySUMOyliertem Wss1 in $\Delta slx5$ sprechen daher für einen Slx5-vermittelten SUMO-abhängigen Abbau von Wss1.

Wss1 ist ein kurzlebiges Protein, wobei mehrere Daten darauf hindeuten, dass Wss1 sowohl SUMOylierungs-abhängig als auch SUMOylierungs-unabhängig abgebaut und reguliert wird. Eine attraktive Erklärung ist, dass aktives Wss1 durch monoSUMOylierung zunächst stabilisiert wird. Nachdem Wss1 aktiv gewesen ist wird es Di-bzw. polySUMOyliert, was zur Inaktivierung von Wss1 durch den Slx5-abhängigen Abbau führt.

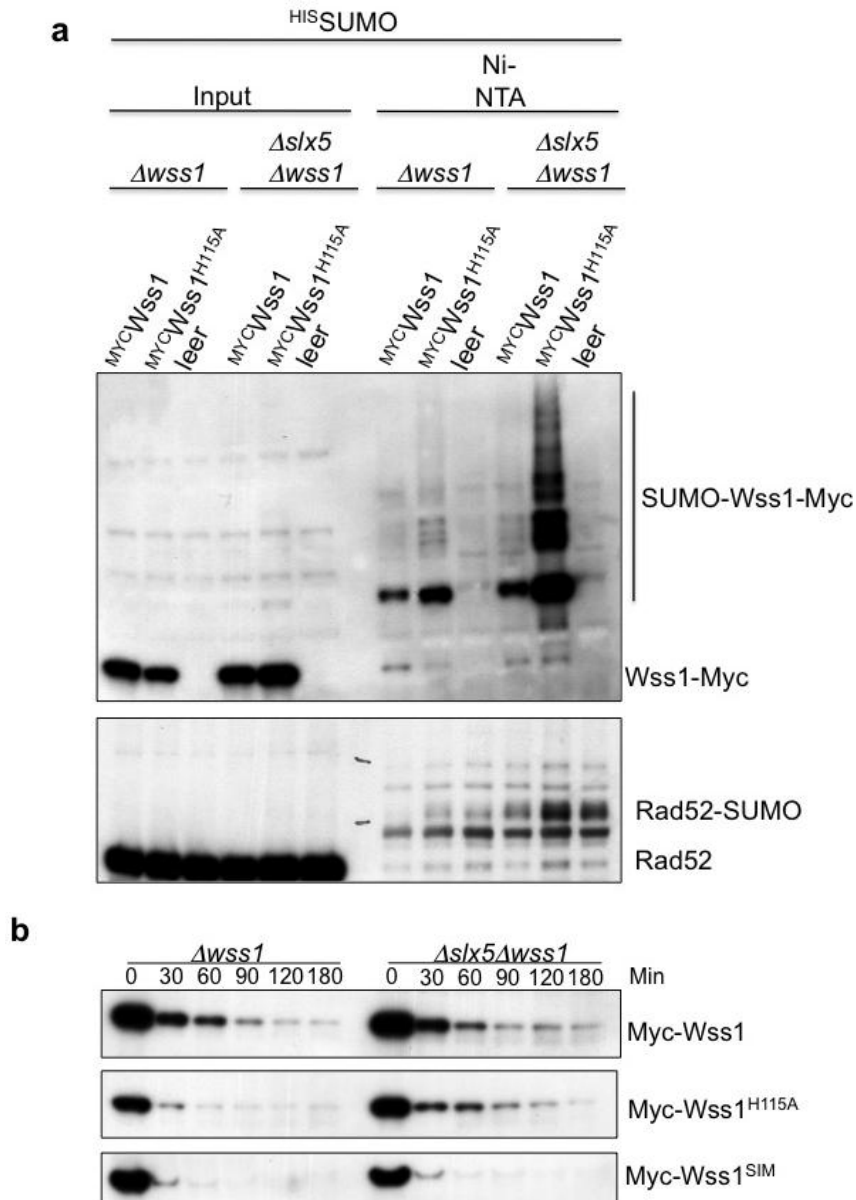


Abb. 39: Eine *SLX5*-Deletion verstärkt die SUMOylierung von Wss1 und supprimiert den Abbau der Pd-Wss1-Variante.

a. Analyse der SUMOylierung von Myc-markiertem Wss1, Wss1^{H115A} im $\Delta wss1$ - bzw. $\Delta wss1 \Delta slx5$ -Stamm, die His-SUMO überexprimieren. SUMOylierte Proteine wurden durch Ni-NTA Chromatographie präzipitiert und Myc-Wss1 anschließend mittels anti-Myc Antikörpern im Immunblot detektiert. Als Kontrolle diente die SUMOylierung von Rad52. **b.** *CHX chase*-Experiment von Wss1, Wss1^{H115A}, Wss1^{SIM} in $\Delta wss1$ und $\Delta wss1 \Delta slx5$. Myc-markiertes Wss1 bzw. Wss1-Varianten wurden im Immunblot mit anti-Myc Antikörpern analysiert.

3. Diskussion

Die AAA-ATPase Cdc48 ist ein essentieller Bestandteil zahlreicher zellulärer Prozesswege, die über die Ubiquitylierung von Proteinen vermittelt werden. In dieser Arbeit konnte erstmals auch eine Verbindung von Cdc48 mit dem SUMO-System aufgezeigt werden. So wurden die SUMO-Interaktoren Wss1 und Tdp1 als neue Cdc48-Kofaktoren identifiziert und beschrieben.

Dies lässt zudem vermuten, dass Cdc48 an der Reparatur von Top1-DNA-Addukten beteiligt ist. So besteht eine Funktion von Tdp1 darin Top1 von der DNA abzuschneiden. Bemerkenswerterweise besitzt die Doppeldeletion der beiden neuen Kofaktoren ($\Delta wss1 \Delta tdp1$) einen starken Wachstumsdefekt, der wiederum von *TOP1* abhängt. Dies legt nahe, dass auch die Protease Wss1 an der Reparatur von Top1-DNA-Addukten beteiligt ist. In der Tat kann Wss1 *in vitro* Top1 schneiden. Somit konnte auch gezeigt werden, dass Wss1 in der Tat proteolytische Aktivität besitzt.

Wss1 und Tdp1 binden interessanterweise kompetitiv an Cdc48. Für die Funktion von Wss1 ist die Interaktion mit Cdc48 essentiell. Zudem verliert Wss1 seine Funktionalität, wenn die proteolytische Aktivität beeinflusst wird. Mehrere Befunde deuten darauf hin, dass Wss1 und Cdc48 bei bestimmten DNA-Reparaturwegen, wie der Rad52-abhängigen homologen Rekombination, sowie der Reparatur von Top1-DNA-Addukten, zusammenwirken. Die genetischen und physischen Interaktionen von Wss1 und Cdc48 lassen vermuten, dass Wss1 mit Hilfe von Cdc48 zum SUMOylierten- und ubiquitylierten Substrat rekrutiert wird. Anschließend kann das Substrat von Wss1 proteolytisch geschnitten werden.

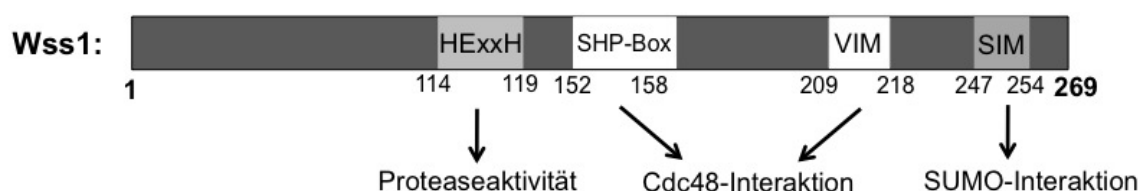


Abb. 40: Schematische Darstellung von Wss1.

Wss1 besitzt eine essentielle Protease-Domäne (HExxH) und ein C-terminales SIM. Die Interaktion mit Cdc48 erfolgt über die SHP-Box-Domäne und ein VIM-ähnliches Motiv. Die Zahlen geben die jeweiligen Aminosäurereste an.

3.1 Wss1 und Tdp1 als neue Kofaktoren von Cdc48

Kofaktoren von Cdc48 werden allgemein in Substratrekrutierungs- und Substratprozessierungs-Faktoren unterteilt. Aus der Interaktion von Cdc48 mit verschiedenen Kofaktoren resultiert die Spezifität der AAA-ATPase und das weitere Schicksal des Substrats. Nachdem die Rekrutierung von Cdc48 zum Substrat essentiell ist, besitzen Mutanten von Rekrutierungsfaktoren, wie Ufd1/Npl4 oder Shp1, schwere Wachstumsdefekte. Die Phänotypen von Mutanten der Substratprozessierungs-Faktoren hingegen sind in der Regel schwächer.

Die genaue Regulierung der Kofaktor-Bindung an Cdc48 ist allerdings weitgehend unklar. So können sich die Bindungen von Kofaktoren teilweise wechselseitig ausschließen wie dies z.B. bei den Substratrekrutierungs-Faktoren Shp1 und Ufd1/Npl4 oder den Prozessierungs-Faktoren Ufd2 und Ufd3 der Fall ist (Rumpf und Jentsch, 2006). Je nach Funktion des Kofaktors, kann die Cdc48-Kofaktor-Interaktion demnach zu komplett unterschiedlichen Funktionen von Cdc48 führen. Auch für Wss1 und Tdp1 konnte ein wechselseitiger Ausschluß der Cdc48-Interaktion *in vitro* gezeigt werden. Beide Proteine binden an die N-Domäne von Cdc48, könnten also mit derselben Bindestelle auf Cdc48 interagieren (siehe Abb. 16 und Abb. 21). Wss1 bindet über zwei Interaktionsmotive an Cdc48, die SHP-Box sowie das VIM-ähnliche Motiv (**Abb. 40** und siehe Abb. 17b). Interessanterweise scheint auch Tdp1 ein VIM-ähnliches Motiv zu besitzen (Kay Hoffman, persönliche Mitteilung). Allerdings ist dieses funktional nicht charakterisiert. Es ist dennoch vorstellbar, dass Wss1 und Tdp1, über das VIM-ähnliche Motiv, dieselbe Interaktionsdomäne auf Cdc48 erkennen und binden. Dies würde zum "Abdecken" der Cdc48-Bindestellen durch eines der beiden Proteine führen, was die kompetitive Interaktion von Wss1 und Tdp1 mit Cdc48 erklären würde. Diese Art der Konkurrenz findet sich, u.a. bei den Cdc48-Kofaktoren Ufd1/Npl4 und Shp1. So bindet Shp1 als Trimer an Cdc48. Dies führt dazu, dass die Bindestellen für den Ufd1/Npl4-Heterodimer bedeckt sind und dieser Komplex nicht mehr an Cdc48 binden kann (Beuron et al., 2006). Die Bindung von Ufd1/Npl4 an Cdc48 wiederum inhibiert die Shp1-Bindung durch eine Konformationsänderung der N-Domäne von Cdc48. Auch

eine Konformationsänderung ist theoretisch für den wechselseitigen Ausschluß der Wss1- bzw. Tdp1-Interaktion mit Cdc48 denkbar.

Durch Expression einer Cdc48-Interaktionsdefizienten Variante (*wss1*^{SHPBOX^{AA}}) konnte für Wss1 zudem gezeigt werden, dass die Interaktion mit Cdc48 essentiell für die Funktion der Protease ist (siehe Abb. 17d und Abb. 23). So kann die Expression dieser Variante die HU-Sensitivität von $\Delta wss1$ bzw. den *ts*-Phänotyp von $\Delta wss1 \Delta tdp1$ nicht mehr retten. Ein Grund dafür könnte sein, dass Cdc48 die Substrat-Interaktionen von Wss1 reguliert. So ist die Cdc48-Interaktionsdefiziente Variante von Wss1 (*Wss1*^{SHPBOX^{AA}}) *in vivo* scheinbar nicht mehr in der Lage an SUMOylierte Proteine zu binden. Bei diesen handelt es sich vermutlich um die Substrate der proteolytischen Aktivität von Wss1, die von Wss1 direkt geschnitten werden.

Interessanterweise gibt es in Hefe mehrere AAA-ATPase-Proteine (AAA-Proteasen) die sowohl eine N-terminale AAA-ATPase- als auch eine C-terminale Protease-Domäne aufweisen und somit in einem Polypeptid beide Aktivitäten vereinen. Zu diesen Proteinen gehören u.a. die mitochondriale AAA-Protease Lon und die homologen Proteine der bakteriellen AAA-Protease FtsH, Yta10, Yta11 und Yta12 (Licht und Lee, 2008). Die membranständige Metalloprotease FtsH lokalisiert an die innere mitochondriale Membran und spielt eine wichtige Rolle bei der gezielten Degradation von beschädigten Membranproteinen. Höchstwahrscheinlich liefert die AAA-ATPase dabei die motorische Kraft um das Substrat aus der mitochondrialen Membran zu ziehen, zu entfalten und das Polypeptid in die proteolytische Kammer weiterzuleiten, wo das Substrat degradiert wird. Während sich bei den bekannten AAA-Proteasen, die Protease-Domäne am C-Terminus befindet, lokalisiert Wss1 nicht an den C-terminalen Bereich von Cdc48 sondern an dessen N-Domäne. Dies könnte eventuell dafür sprechen, dass Wss1 für seine proteolytische Funktion kein vorheriges Cdc48-vermitteltes Entfalten des Substrats benötigt.

Die Rolle von Wss1 als Cdc48-Adaptorprotein wurde zudem mit Hilfe genetischer Epistasis-Analysen untersucht. So konnte durch Doppeldeletionen von $\Delta wss1$ und Mutanten des UFD-*pathways* gezeigt werden, dass *WSS1* eine Rolle im Protein-Abbau spielt. Im Gegensatz zu Mutanten der Cdc48-Kofaktoren *UFD1* und

SH_P1 sind die Phänotypen allerdings sehr schwach (siehe Abb. 18). Wss1 ist im Gegensatz zu diesen Kofaktoren demnach eher an bestimmten Unterfunktionen von Cdc48 beteiligt. Daher führt eine *WSS1*-Deletion erst in Kombination mit Mutanten der anderen Cdc48-Kofaktoren zu Wachstumsdefekten. Für eine Beteiligung von Wss1 an bestimmten Cdc48-Funktionen spricht auch, dass das kurzlebige nukleäre Ubiquitin-Fusionsprotein (Ubi-P- β -Gal) in $\Delta wss1$ leicht stabilisiert ist (siehe Abb. 19), wohingegen eine *WSS1*-Deletion scheinbar keinen Einfluß auf ERAD hat.

3.2 Die Substratspezifität von Wss1

Neben der Interaktion mit Cdc48 ist auch die proteolytische Aktivität wichtig für die Funktion von Wss1. So konnte keiner der untersuchten $\Delta wss1$ -Phänotypen durch Expression der Protease-defizienten (Pd) Variante von Wss1 (*wss1^{H115A}*) gerettet werden (siehe Abb. 10 bzw. Abb. 23). Dies ließ die Frage aufkommen, auf was Wss1 proteolytisch agiert.

Mehrere Ergebnisse dieser Doktorarbeit deuten dabei darauf hin, dass Wss1 proteolytisch auf polySUMOylierte ubiquitylierte Substrate wirkt. So konnte durch Immunpräzipitationen gezeigt werden, dass die Interaktion der Pd-Variante mit polySUMOylierten ubiquitylierten Proteinen, verglichen mit Wss1-WT, verstärkt ist (siehe Abb. 12). Die Interaktion von Wss1-WT und der Pd-Variante mit Cdc48 ist hingegen nicht beeinflusst. Dies lässt vermuten, dass die Pd-Variante zwar an SUMOylierte ubiquitylierte Proteine binden, diese aber nicht mehr schneiden kann. Aus diesem Grund ist die Enzym-Substrat-Interaktion, d.h. die Interaktion von Wss1 mit SUMOylierten ubiquitylierten Substraten, stabilisiert.

Für Wss1 sind mehrere Substratspezifitäten denkbar. So könnte Wss1 sowohl auf die modifizierten Substrate, als auch direkt auf SUMO bzw. Ubiquitin proteolytisch agieren. Wss1 könnte aber auch ein neuartiges deSUMOylierendes (Ulp) bzw. deubiquitylierendes (DUB) Enzym darstellen. In dieser Arbeit konnten jedoch keine Hinweise gefunden werden, dass Wss1 als Ulp bzw. DUB funktioniert. So konnte Wss1 *in vitro* weder SUMO von SUMO-GST noch Ubiquitin von Ubiquitin-GST abschneiden (siehe Abb. 30 und Abb. 37, Daten nicht gezeigt). Auch

PolySUMO- und PolyUbiquitinketten (K48- und K63-verknüpft) wurden *in vitro* von Wss1 nicht geschnitten. Zudem spricht einiges dafür, dass Wss1 das SUMOylierte ubiquitylierte Protein zwar bindet, aber scheinbar direkt im Substrat schneidet. So konnte Wss1 *in vitro* unmodifizierte Substrate, wie Top1 bzw. Wss1 schneiden (siehe Abb. 30 und Abb. 37). Für Wss1 konnte zudem gezeigt werden, dass es sich auch *in vivo* selbst schneidet. Demnach handelt es sich bei Wss1 um eine aktive Protease, die scheinbar direkt im Substrat schneiden kann.

3.2.1 Wss1 und Cdc48 als neue Komponenten des SUMO-abhängigen Protein-Abbaus

PolySUMOylierte Proteine werden höchstwahrscheinlich Slx5-abhängig ubiquityliert und anschließend vom Proteasom abgebaut (Uzunova et al., 2007). Interessanterweise ist die Wss1-Interaktion mit SUMOylierten Proteinen scheinbar abhängig von *SLX5*. So bindet Wss1 in $\Delta slx5$ nicht mehr an polySUMOylierte Proteine (siehe Abb. 24b). Außerdem ist die Eigenschaft von SUMO, PolySUMO-Ketten bilden zu können, wichtig für die Interaktion von Wss1 mit SUMOylierten Proteinen (siehe Abb. 12b). Zudem sind Gendelektionen von *SLX5* und *WSS1* epistatisch (siehe Abb. 24a). Eine *SLX5*-Deletion verhält sich demnach wie eine *WSS1 SLX5*-Doppeldelenon. Die genetische und die direkte Interaktion von Wss1 und Slx5 sprechen dafür, dass die Proteine im selben Prozessweg agieren. Auch die Wss1-Bindung an Cdc48 ist scheinbar wichtig für die Interaktion von Wss1 mit SUMOylierten Proteinen. Die Substrat-Spezifität von Wss1 würde demnach davon abhängen, welche SUMOylierten Proteine über Cdc48 rekrutiert werden. Dafür spricht auch, dass im Bindungs-Experiment für neue Wss1-Interaktoren hauptsächlich Cdc48 gefunden wurde (siehe Abb. 14). Wss1 scheint daher präferentiell an Cdc48 zu binden. Dies und die Verbindung zu *SLX5* legen nahe, dass Substrate von Wss1 zunächst ubiquityliert werden müssen bevor diese von Cdc48 erkannt werden können. Wss1 würde demnach über Cdc48 an ubiquitylierte SUMOylierte-Substrate rekrutiert werden.

Ferner sprechen verschiedene Ergebnisse auch für eine direkte Beteiligung von Cdc48 am SUMO-abhängigen Protein-Abbau. So kommt es in *cdc48-6* und *ufd1-2*, ähnlich wie in Δ *slx5*, zur Akkumulierung von polySUMOylierten Proteinen (siehe Abb. 33a). Dies ist charakteristisch für Gendelektionstämme von Proteinen, die beim Abbau dieser SUMO-Substrate eine Rolle spielen (Uzunova et al., 2007). Dies lässt zusätzlich vermuten, dass Cdc48 auf wesentlich mehr SUMOylierte Substrate agiert als Wss1. So scheint Wss1 lediglich auf bestimmte SUMOylierte Substrate zu wirken, da in Δ *wss1* keine generelle deutliche Stabilisierung von polySUMOylierten Substraten zu erkennen ist. Ein weiterer Punkt, der für eine Beteiligung von Cdc48 am SUMO-abhängigen Proteinabbau spricht, ist die Interaktion von Cdc48 mit dem STUBL Slx5. Zudem konnte für Cdc48 und Ufd1 das Vorhandensein eines SIMs beschrieben sowie eine Y2H-Interaktion mit SUMO nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 2.6).

Die Interaktionen von Wss1 und Cdc48 sowie die Cdc48-Bindung an Slx5 legen dabei folgendes Arbeitsmodell nahe (**Abb. 41**): Proteine werden zunächst monoSUMOyliert, bevor sie polySUMOyliert und ubiquityliert werden. Die Ubiquitylierung des Substrats führt zur anschließenden Rekrutierung von Cdc48 und damit auch von Wss1 (Cdc48^{Wss1}-Komplex).

Die unterschiedlichen Modifikationen des Substrats könnten dabei verschiedene Funktionen besitzen. So kann die monoSUMOylierung eines Substrats eine bestimmte Funktion A des Substrats beeinflussen (siehe Abschnitt 1.2). Die PolySUMOylierung des Substrats könnte wiederum eine bestimmte Funktion B beeinflussen sowie zur Rekrutierung von spezifischen SUMO-bindenden Ubiquitinligasen (Slx5/Slx8) führen. Slx5 besitzt 4 funktionale SIMs, sodass der Slx5/Slx8-Komplex scheinbar präferentiell mit polySUMOylierten Proteinen interagiert. Die Ubiquitylierung des Substrats erfolgt über Slx8, wobei diese im Substrat an einer anderen Stelle wie die SUMOylierung stattfinden oder auch direkt an SUMO erfolgen kann (Mullen und Brill, 2008). Die anschließende Rekrutierung des Cdc48^{Wss1}-Komplexes an das ubiquitylierte Substrat führt dazu, dass Wss1 proteolytisch auf das polySUMOylierte Substrat wirken kann.

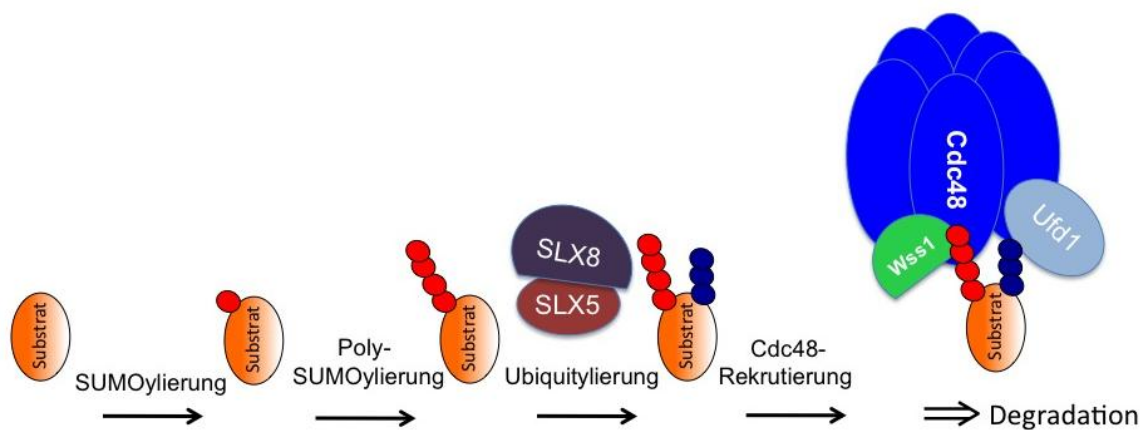


Abb. 41: Speklatives Modell für eine Rolle von Cdc48 und Wss1 im SUMO-abhängigen Protein-Abbau.

Erläuterung siehe Text. SUMO ist rot und Ubiquitin blau dargestellt.

Die Interaktion von Wss1 mit Cdc48 könnte aber auch für die proteolytische Aktivität von Wss1 wichtig sein. Dafür spricht u.a. die Struktur von Wss1. So konnte für das *S. pombe* Homologe von Wss1 gezeigt werden, dass in der kompakten Struktur von Wss1 die Protease-Domäne und der C-terminale Bereich, in dem in *S. cerevisiae* Wss1 das SIM liegt, genau gegenüberliegen (Prof. Michael Groll, persönliche Mitteilung). Gebundene SUMOylierte Proteine können demnach nur geschnitten werden, wenn diese mit der gegenüberliegenden Proteasedomäne in Kontakt kommen. Nachdem Cdc48 als Hexamer mehrere Bindestellen für Wss1 aufweist, könnten dementsprechend auch mehrere Wss1-Proteine mit Cdc48 simultan interagieren. Daraus ergibt sich das Modell, dass ein Wss1-Protein das SUMOylierte Substrat bindet, wodurch ein anderes Wss1-Protein mit seiner Protease-Domäne in räumliche Nähe zu dem Substrat kommt und dieses schneiden kann (**Abb. 42a**).

Vorstellbar wäre aber auch, dass sich Wss1 nach der Rekrutierung an das Substrat, von Cdc48 löst und direkt an das SUMOylierte Protein bindet. Die Tatsache, dass das SIM gegenüber von der Proteasedomäne liegt würde dementsprechend dazu führen, dass das SUMOylierte Protein auch räumlich in die Nähe der Protease-Domäne kommen muss, um geschnitten zu werden. Eventuell könnte eine Substrat-Modifikation mit einer PolySUMO-Kette dies strukturell erleichtern (**Abb. 42b**).

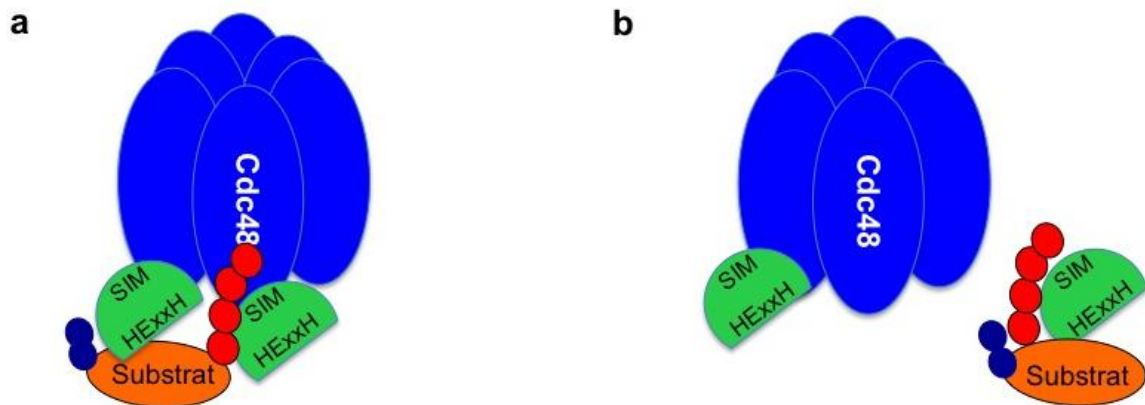


Abb. 42: Schematische Darstellung der möglichen Substraterkennung von Wss1.

a. Mehrere Wss1-Proteine (grün dargestellt) interagieren, über ihre spezifischen Interaktionsdomänen, mit dem Cdc48-Hexamer. Bindet ein Wss1-Protein über sein SIM an SUMOylierte Proteine (SUMO ist rot und Ubiquitin blau dargestellt), so führt dies dazu, dass das Substrat in räumliche Nähe zu der Proteasedomäne (HExxH) eines weiteren Wss1-Proteins kommt und dadurch geschnitten wird. **b.** Wss1 löst sich nach Rekrutierung an das Substrat von Cdc48 und erkennt das SUMOylierte Protein unabhängig von Cdc48.

3.2.2 Identifikation von Wss1-Substraten

Im Rahmen der Doktorarbeit konnten verschiedene mögliche Substrate für Wss1 identifiziert werden. Ein Substrat das sowohl *in vivo* als auch *in vitro* von Wss1 geschnitten wird, ist Wss1 selbst (siehe Abschnitt 2.8.1). Dabei schneidet Wss1 *in trans*, d.h. ein Wss1-Protein erkennt ein anderes und schneidet dieses. Dies konnte durch das Schneiden der Pd-Variante (Wss1^{H115A}) im WT-, nicht aber im $\Delta wss1$ -Stammhintergrund gezeigt werden. Zudem wird die aufgereinigte Pd-Variante *in vitro* von WT-Wss1 geschnitten. Wie das Schneiden von Wss1 reguliert und wann Wss1 geschnitten wird ist unklar. Allerdings wird Wss1 auch SUMOyliert, sodass dies über die SUMOylierung von Wss1 reguliert werden könnte.

Mit Top1 konnte ein weiteres SUMO-Substrat identifiziert werden, dass von Wss1 *in vitro* geschnitten werden kann (siehe Abschnitt 2.4.6). Zudem deuten mehrere genetische Daten darauf hin, dass Top1 auch *in vivo* ein Substrat von Wss1 sein könnte (siehe Abschnitt 3.3). Dennoch ist unklar, ob Top1 von Wss1 auch *in vivo* geschnitten wird.

Ein weiteres putatives Wss1-Substrat ist das DNA-Reparaturprotein Rad52 (siehe Abschnitt 2.5). So führt eine WSS1-Deletion zu einem Anstieg an SUMOyliertem Rad52, ohne jedoch dessen Ubiquitylierung zu verändern. Bei SUMOyliertem Rad52 geht man davon aus, dass hauptsächlich die an der Rekombination beteiligte Form von Rad52 SUMOyliert ist (Sacher et al., 2006). Zudem führt die Überexpression der Wss1-Pd-Variante zu einer verstärkten Rad52-SUMOylierung ohne dass die Ubiquitylierung von Rad52 verändert wurde. Dies lässt vermuten, dass Wss1 direkt auf Rad52 wirkt und die Pd-Variante, durch seine "Substrat-Fallen"-Funktion, die SUMOylierte Form von Rad52 bindet und damit stabilisiert. Somit könnte die Pd-Variante z.B. die deSUMOylierung von Rad52 oder die SUMO-vermittelte Interaktion mit einem anderen Reparaturprotein blockieren. Vermutlich würde somit speziell das an der Rekombination beteiligte Rad52 SUMOyliert bleiben, was auch den pro-rekombinations-Phänotyp der Pd-Variante erklären könnte. So kommt es bei Überexpression der Pd-Variante in einem intrachromosomalen Rekombinations-Testsystem zu einem pro-rekombinatorischen Phänotyp. Bei Überexpression von Wss1-WT in diesem Testsystem kommt es hingegen zu einer Reduktion an rekombinatorischen Ereignissen. Interessanterweise führt die Verwendung einer nicht mehr SUMOylierbaren Rad52-Variante in diesem Testsystem zu einem ähnlichen Phänotyp wie bei Überexpression von Wss1. Für einen direkten Einfluß von Wss1 auf Rad52 spricht auch, dass Wss1 in einem Y2H-Experiment SIM-abhängig mit SUMOyliertem Rad52 interagiert. Auch der Nachweis, dass Rad52 physisch mit Cdc48 interagiert (Steven Bergink, persönliche Mitteilung) unterstreicht eine direkte Funktion von Wss1 in bestimmten Rad52-abhängigen Rekombinationsprozessen.

Das interessante an Rad52 ist zudem, dass es als Heptamer bzw. Undecamer vorliegt. Die partielle Degradation von einem Rad52-Protein könnte demnach dazu führen, dass die restlichen Rad52-Untereinheiten leichter disassembliert werden. Cdc48 als AAA-ATPase könnte die motorische Kraft zu dieser Disassemblierung liefern bzw. die Fragmente des von Wss1 geschnittenen Rad52-Proteins an das Proteasom weiterleiten. Für eine Beteiligung von Cdc48 und seinen Kofaktoren spricht auch die additive Zeozin-Sensitivität und erhöhte Rad52-SUMOylierung in $\Delta wss1 \Delta ufd2$ im Vergleich zu den Einzeldelationen der Gene. Hier

könnte die Deletion von *UFD2* eventuell zu einer Stabilisierung der SUMOylierten Form von Rad52 führen, die normalerweise Ubiquitylierungs-abhängig degradiert werden würde. Allerdings gibt es bisher keinen Beweis, dass SUMOyliertes Rad52 *in vivo* tatsächlich Ubiquitylierungs-abhängig abgebaut wird.

Wss1-Substrate wie Rad52 und Top1 könnten auch erklären, warum Wss1 scheinbar nur auf bestimmte SUMOylierte Proteine wirkt. So könnten spezielle Strukturen wie multi-Proteinkomplexe (Rad52) bzw. kovalente Protein-DNA-Verknüpfungen (Top1) die kombinierte Aktivität einer AAA-ATPase und einer Protease zum Disassemblieren benötigen. So könnte u.a. der partielle Top1-Verdau Voraussetzung dafür sein, dass Cdc48 bestimmte Top1-Fragmente von der DNA loslösen kann.

3.3 Die Rolle von Cdc48, Wss1 und Tdp1 bei der Reparatur von kovalent mit der DNA-verknüpftem Top1

3.3.1 Mögliche Funktionen von Cdc48 bei der Reparatur von Top1-DNA-Addukten

Bei der Suche nach genetischen Interaktoren von *WSS1* wurde *TDP1* identifiziert. Für die Doppelmutante $\Delta wss1 \Delta tdp1$ konnte zudem gezeigt werden, dass Top1 für die beobachtete Toxizität in $\Delta wss1 \Delta tdp1$ verantwortlich ist. So konnte der $\Delta wss1 \Delta tdp1$ *ts*-Phänotyp durch Deletion von *TOP1* gerettet werden (siehe Abschnitt 2.4). Zudem besitzt der $\Delta wss1 \Delta tdp1$ -Stamm starke Sensitivitäten gegenüber der Induktion von Top1-DNA-Addukten durch Camptothecin-Zugabe. Somit scheint auch Wss1 an der Reparatur von Top1-DNA-Addukten, den sogenannten *cleavage complexes*, beteiligt zu sein. Eine alternative Erklärung wäre, dass eine *WSS1*-Deletion zu einer vermehrten Anzahl an *cleavage complexes* führt, die Tdp1 abhängig repariert werden müssen.

Die hochkonservierte Phosphodiesterase Tdp1 wirkt spezifisch auf Top1, indem es kovalent gebundenes Top1 von der DNA abschneidet. Interessanterweise

kann Tdp1 den Top1-Tyrosinrest, über den Top1 mit der DNA verknüpft ist, nicht direkt erkennen, da dieser durch die Struktur von Top1 verdeckt ist. Mit Hilfe von *in vitro*-Studien konnte man zudem zeigen, dass Tdp1 nur kovalent mit der DNA-verknüpfte Top1-Peptide bis zu einer Länge von 13 Aminosäureresten abscheiden kann. Daher geht man davon aus, dass Top1 zuerst geschnitten bzw. prozessiert werden oder aber seine Konformation ändern muss, bevor Tdp1 agieren kann. Für humanes Top1 wird hierfür u.a. eine Beteiligung des Proteasoms angenommen (Davies et al., 2003; Debethune et al., 2002). In diesem Zusammenhang ist es äußerst interessant, dass Tdp1 *in vivo* und *in vitro* mit der AAA-ATPase Cdc48 interagieren kann (siehe Abschnitt 2.4.2). Die direkte Interaktion der beiden Proteine und die Tatsache, dass Cdc48 nicht am Abbau von Tdp1 involviert ist, sprechen dafür, dass beide funktional zusammen wirken könnten. Die AAA-ATPase könnte dabei die mechanische Energie liefern um die Konformation von Top1 so zu ändern, dass Tdp1 auf Top1 agieren kann. Alternativ könnte Cdc48 auch an der Prozessierung der Top1-DNA-Addukte über den Cdc48-Kofaktor Wss1 beteiligt sein. Auch eine Funktion von Cdc48 nach der Prozessierung von Top1 durch das Proteasom ist vorstellbar, wie das bei der Mobilisierung des dimeren, ER-membranständigen Transkriptionsfaktors Spt23 der Fall ist. Hierbei muss ein Protein des Spt23-Dimers zuerst vom Proteasom geschnitten werden, bevor Cdc48 das trunkierte Protein von seinem Interaktionspartner loslösen kann (Rape et al., 2001). Auch im Fall von Top1 ist es vorstellbar, dass Top1 zunächst vom Proteasom bzw. von Wss1 geschnitten wird. Dadurch könnte der Tyrosinrest von Top1 für Tdp1 zugänglich werden, sodass Tdp1 das Top1-Fragment, welches noch an der DNA hängt, von der DNA abschneiden kann. In diesem Zusammenhang könnte Cdc48 eventuell sowohl Wss1 als auch Tdp1 zum Top1-*cleavage complex* rekrutieren. Die kompetitive Cdc48-Bindung von Wss1 und Tdp1 *in vitro* schließt dabei ein sequentielles Zusammenwirken beider Faktoren *in vivo* nicht aus. Nach der Aktivität von Wss1 und Tdp1 könnte Cdc48 die Top1-Fragmente an das Proteasom weiterreichen, wo diese abgebaut werden.

Bisher ist unklar, wie Tdp1 die Top1-DNA-Addukte erkennen und somit Top1 abschneiden kann. Im Rahmen der Arbeit konnten verschiedene Hinweise gefunden werden, dass Tdp1 Cdc48-vermittelt an Top1 rekrutiert werden könnte. So bindet

Tdp1 *in vitro* und *in vivo* an Cdc48. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Ubiquitylierung eines Substrats den $\Delta wss1 \Delta tdp1$ -Phänotyp hervorruft, da neben einer *TOP1*- auch eine *SLX5*-Deletion den $\Delta wss1 \Delta tdp1$ *ts*-Phänotyp supprimieren kann (siehe Abb. 22b). Dies lässt vermuten, dass Cdc48 ubiquityliertes Top1 erkennen und dadurch Tdp1 an die Top1-DNA-Addukte rekrutieren könnte. Für Wss1 konnte bereits gezeigt werden, dass die Cdc48-Interaktion in diesem Stammhintergrund für die Funktion von Wss1 essentiell ist. Ähnliches ist auch für die Funktion von Tdp1 denkbar.

Nachdem $\Delta wss1$ in Kombination mit Mutanten der anderen Reparaturwege für Top1-DNA-Addukte keine Wachstumsdefekte oder Camptothecin-Sensitivitäten aufweist, spricht vieles dafür, dass in $\Delta wss1 \Delta tdp1$ eine bestimmte Form bzw. Subpopulation von Top1 der Grund für die Toxizität ist. Top1 ist an vielen zellulären Prozessen, wie z.B. der Transkription und der Chromosomensegregation beteiligt. Je nach Funktion könnte Top1 daher auch unterschiedlich modifiziert sein. Dies mag ein Grund sein, warum zahlreiche Reparaturwege für Top1-DNA-Addukte in der Zelle existieren. In diesen Reparaturwegen spielen u.a. der Rad1/Rad10-, der Slx1/Slx4- sowie der Mus81/Mms4-Komplex eine wichtige Rolle. Hierbei handelt es sich um Endonukleasen, die aufgrund ihrer Camptothecin-Sensitivität, mit der Reparatur von Top1-DNA Addukten in Verbindung gebracht wurden (Deng et al., 2005; Liu et al., 2002). Diese Endonukleasen können in der DNA schneiden und somit den Top1-DNA Komplex von der DNA abschneiden. Ein Zusammenwirken von Wss1 mit diesen Endonukleasen ist daher denkbar. So würde nach der proteolytischen Aktivität von Wss1 ein Top1-Fragment, das mit der DNA-verknüpft ist, zurückbleiben. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit der Aktivität einer Endonuklease bzw. von Tdp1 (**Abb. 43**).

3.3.2 Agieren Wss1 und Tdp1 auf SUMOyliertes und ubiquityliertes Top1?

Die biochemische Funktion von Tdp1 als DNA-Reparaturprotein für Top1-DNA-Addukte ist relativ gut erforscht. Allerdings ist unklar, wie Tdp1 kovalente Top1-DNA-Addukte erkennen kann bzw. wie der Abbau dieses Top1-DNA-Addukts eingeleitet

wird. Schließlich ist es für die Zelle wichtig zwischen aktivem Top1 und inaktivem, dauerhaft kovalenten mit der DNA verknüpftem Top1 unterscheiden zu können. Vieles spricht dafür, dass die SUMOylierung von Top1 dabei eine Rolle spielen könnte. So kann die SUMOylierung von Top1 durch Camptothecin-Zugabe induziert werden und die SUMOylierte Form von Top1 akkumuliert hauptsächlich an der DNA (Horie et al., 2002). Allerdings ist unklar, wer die Interaktionspartner von SUMOyliertem Top1 sind und was genau die Konsequenz der SUMOylierung von Top1 ist. Im Rahmen der Doktorarbeit konnten mehrere Hinweise dafür gefunden werden, dass Tdp1 und Wss1 SUMOyliertes und ubiquityliertes Top1 erkennen und darauf wirken können.

Für beide Proteine konnte zusätzlich eine mögliche Funktion als neue Cdc48-Kofaktoren bzw. Adaptorproteine beschrieben werden (siehe Abschnitt 3.3.1). Für Wss1 wurde des Weiteren eine mögliche Beteiligung am SUMO-abhängigen Abbau von Proteinen beschrieben. Einige Daten sprechen dafür, dass auch Tdp1 in diesem Prozessweg eine Rolle spielt und SUMOyliertes Top1 ein Substrat des SUMO-abhängigen Protein-Abbaus ist. Eine genetische Verbindung von $\Delta wss1$ und $\Delta tdp1$ zu diesem SUMO-abhängigen Protein-Abbau ergibt sich durch den Nachweis, dass der $\Delta wss1 \Delta tdp1$ ts-Phänotyp, sowohl durch Deletion des STUBLs *SLX5*, wie auch durch Deletion von *SIZ1* und *SIZ2*, den zwei SUMOligasen für Top1, supprimiert werden kann (siehe Abb. 22). Dies spricht dafür, dass ein SUMOyliertes Protein, das abgebaut werden muss, das toxische Substrat darstellen könnte. Interessanterweise besteht auch eine physische Verbindung von Wss1 und Tdp1 zum SUMO-abhängigen Protein-Abbau. Neben der Entdeckung, dass Wss1 und Tdp1 jeweils ein SIM besitzen, konnte zusätzlich gezeigt werden, dass beide Proteine an SUMOylierte Proteine und Slx5 binden. Darüber hinaus führt eine *TDP1*-Deletion in $\Delta ulp2$ zu Letalität bei Zugabe der Top1-spezifischen Droge Camptothecin. Vermutlich akkumuliert in diesem Hintergrund speziell polySUMOyliertes Top1 an der DNA, dass in der Regel Tdp1-abhängig hydrolysiert wird. Dementsprechend führt die Zugabe von Camptothecin im $\Delta tdp1 \Delta ulp2$ -Stamm zu Letalität.

Für humanes Top1 wurde zudem gezeigt, dass nach Camptothecin-Zugabe die SUMOylierung von Top1 deutlich zunimmt und die Proteinmenge von Top1 insgesamt stark abnimmt. Der verstärkte Top1-Abbau wird dabei wie folgt erklärt:

Durch die Zugabe von Camptothecin wird das Top1-DNA Addukt stabilisiert, wodurch Top1 SUMOyliert und abgebaut wird. Dies führt dazu, dass die torsionale Spannung in der DNA nicht relaxiert werden kann und wiederum Top1 an die DNA rekrutiert wird. Dadurch wiederholt sich der Zyklus, dass Top1 durch Camptothecin inhibiert und abgebaut wird. Letztendlich wird somit Top1 allmählich aus der Zelle depletiert. Ein Phänotyp, der interessanterweise auch in $\Delta wss1$ sichtbar ist (siehe Abschnitt 2.4.5). Hierbei führt die Deletion von *WSS1*, speziell unter SUMO-Überexpressions-Bedingungen und bei Camptothecin-Zugabe zu einer Reduktion der Proteinmenge von Top1.

Diese generelle Reduktion der Proteinmenge von Top1 im *WSS1*-Deletionshintergrund könnte auch die Suppression des *ts*-Phänotyps der *ULP2*-Deletionsmutante durch die Deletion von *WSS1* erklären. So kann der *ts*-Phänotyp der *ULP2*-Deletionsmutante auch durch Deletion von *TOP1* supprimiert werden. Interessanterweise führt eine Deletion der Ubiquitinligasen *SLX5* bzw. *SLX8* im $\Delta wss1 \Delta ulp2$ -Stammhintergrund, nicht allerdings im $\Delta wss1 \Delta ulp2 \Delta top1$ -Hintergrund, zu schweren Wachstumsdefekten, (siehe Abb. 26). Eine attraktive Erklärung ist, dass in $\Delta ulp2$ hauptsächlich Top1 das toxische SUMO-Substrat darstellt, welches Slx5/Slx8-abhängig abgebaut werden muss.

Dieser SUMO-abhängige Top1-Abbau könnte auch den anfänglich widersprüchlichen Befund erklären, warum in $\Delta wss1$ (ein Gen das für eine Protease kodiert, die vermutlich direkt auf Top1-DNA-Addukte wirkt) Top1 schneller, statt schlechter abgebaut wird. So würde eine *WSS1*-Deletion zu einer vermehrten Zahl an SUMOylierten Top1-DNA-Addukten führen. Nachdem Tdp1 und Wss1 kompetitiv an Cdc48 binden, könnte Tdp1 in Abwesenheit von Wss1 zudem besser mit Cdc48 interagieren. Dies würde einen effizienteren Abbau von Top1 über Slx5 und Tdp1 bewirken.

Ein Hinweis dafür, dass Wss1 und Tdp1 alternativ auf SUMOyliertes Top1 agieren könnten, ist der Befund, dass eine *Wss1*-Überexpression die Camptothecin-Sensitivität von $\Delta tdp1 \Delta ulp2$ supprimieren kann, abhängig von der Protease-Aktivität von Wss1 (siehe Abb. 25b). Dies lässt vermuten, dass Top1 das Substrat für die proteolytische Aktivität von Wss1 ist. Allerdings muss durch die Expression der

entsprechenden Top1-Lysinvarianten noch untersucht werden, ob es sich bei dem toxischen Substrat wirklich um SUMOyliertes und ubiquityliertes Top1 handelt.

Die Top1-spezifischen Phänotypen in Mutanten der SUMO-Kaskade und die Funktion von Tdp1 als DNA-Reparaturprotein spezifisch für Top1-DNA-Addukte lassen allerdings vermuten, dass Tdp1 auf SUMOyliertes Top1 agiert. Dafür spricht auch, dass es ein SIM aufweist und SUMOylierte Proteine binden kann. Die genaue proteolytische Rolle von Wss1 ist unklar, jedoch lässt die Interaktion von Cdc48 und Tdp1 vermuten, dass auch Cdc48 am Abbau von Top1 beteiligt ist. Der Tatsache entsprechend, dass Wss1 ein neuer Kofaktor von Cdc48 ist, der vermutlich im SUMO-abhängigen Proteinabbau eine Rolle spielt, sowie aufgrund der genetischen Daten und dem *in vitro*-Schneiden von Top1, ergibt sich folgendes Arbeitsmodell (**Abb. 43**):

DNA-verknüpftes Top1 wird abhängig von den SUMO-Ligasen Siz1 und Siz2 SUMOyliert. Nach der Rekrutierung von Slx5 und der Ubiquitylierung von Top1 bindet Cdc48 an die modifizierte Form von Top1. Durch die Interaktion von Cdc48 mit Tdp1 bzw. Wss1 kommt es zur Hydrolyse bzw. zum Abschneiden von Top1 von der DNA. Die genaue Funktion von Cdc48 ist unklar. Ebenso inwieweit andere Top1-Reparaturproteine involviert sind. Jedoch ist anzunehmen, dass Top1 nicht komplett von Wss1 degradiert wird und somit ein Fragment von Top1 an der DNA zurückbleibt, welches endonukleolytisch oder über Tdp1 geschnitten werden muss.

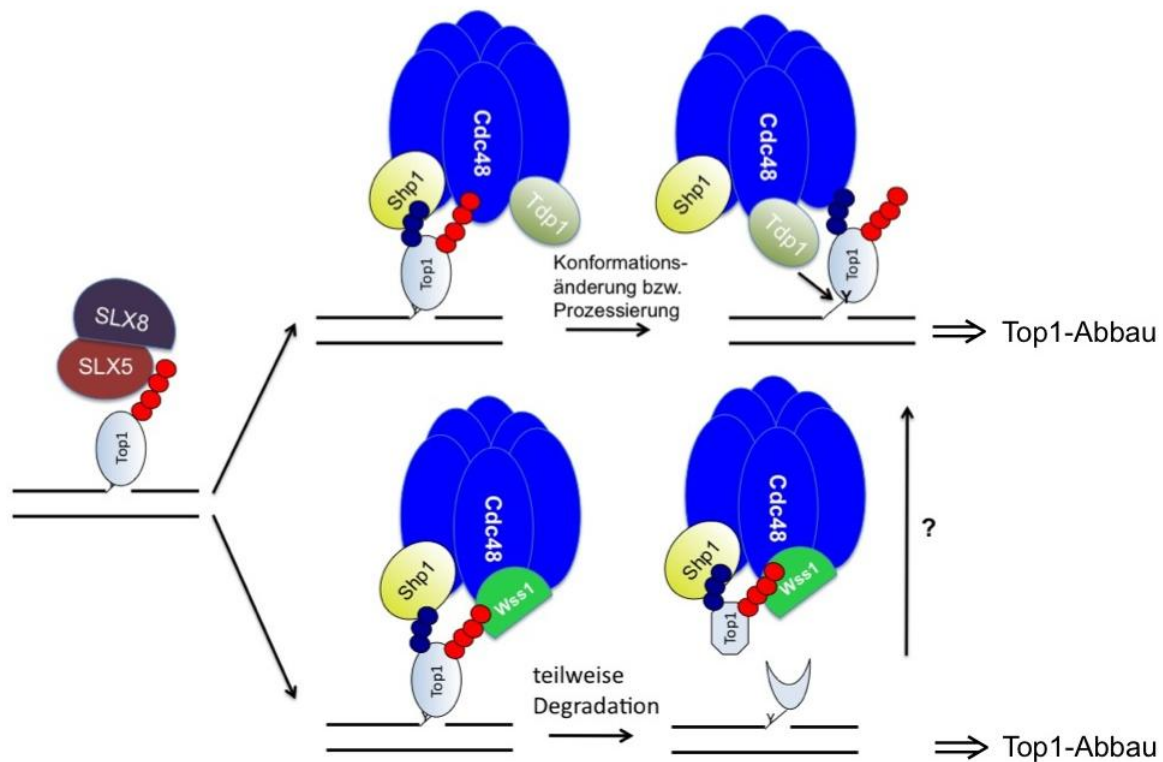


Abb. 43: Model für das Zusammenwirken von Cdc48 mit Wss1 und Tdp1 beim Prozessieren von Top1-DNA-Addukten.

Der STUBL-Komplex Slx5/Slx8 ubiquityliert spezifisch polySUMOylierte Top1-DNA-Addukte (SUMO ist rot und Ubiquitin blau dargestellt). Dies führt zur Rekrutierung von Cdc48 und seinen Kofaktoren, d.h. entweder mit Tdp1 oder mit der Protease Wss1. Höchstwahrscheinlich bindet Cdc48 dabei über Kofaktoren, wie Shp1 oder Ufd1/Npl4, an ubiquityliertes Top1. Zur Vereinfachung ist nur Shp1 dargestellt. Ob Wss1 mit Tdp1 funktional zusammenwirkt oder ob Wss1 unabhängig von Tdp1 auf Top1 proteolytisch wirkt ist unklar. Die Interaktion von Cdc48 mit ubiquityliertem Top1 könnte daher sowohl zum Schneiden von Top1 durch Wss1 als auch zur Top1-Konformationsänderung durch die AAA-ATPase-Aktivität von Cdc48 selbst führen. In beiden Fällen würde höchstwahrscheinlich das Top1-Tyrosin (Y), mit dem Top1 mit der DNA-verknüpft ist, für Tdp1 zugänglich werden. Dadurch könnte Tdp1 Top1 bzw. das Top1-Fragment von der DNA abschneiden. Alternativ zu dem Tdp1-vermittelten Prozessweg könnte nach der proteolytischen Aktivität von Wss1, auch ein anderes Enzym (nicht dargestellt) Top1 von der DNA abschneiden.

3.4 Die Regulation der Wss1-Aktivität

3.4.1 Wss1 reguliert sich selbst

Proteasen unterliegen in der Zelle verschiedener Regulationsmechanismen. Diese Regulation ist lebenswichtig für die Zelle, da die Aktivität einer Protease irreversibel ist. Für Wss1 konnte gezeigt werden, dass es sich *in trans* schneidet und sich so selbst regulieren könnte (siehe Abschnitt 2.8). Das Abschneiden des C-terminalen Bereichs führt dabei zum Verlust des SIMs. Dies könnte eine stabile Interaktion mit den SUMOylierten Substraten verhindern. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass die trunkierte Form von Wss1 aktiv ist und andere Funktionen, unabhängig von der Interaktion mit SUMOylierten Proteinen, besitzt.

3.4.2 Wird Wss1 über den Slx5-abhängigen Proteinabbau reguliert?

Wss1 ist ein relativ kurzlebiges Protein (siehe Abschnitt 2.8.2). Dabei scheint es, als ob die Halbwertszeit der Protease über deren SUMOylierung reguliert werden würde (siehe Abb. 39b). Sowohl die nur schwach- (Wss1^{SIM}) als auch die extrem stark- ($\text{Wss1}^{\text{H115A}}$) SUMOylierte Form von Wss1 ist kurzlebiger als WT-Wss1. Dabei ist die schnellere Degradation der Pd-Variante abhängig von *SLX5* (siehe Abb. 39b). Entsprechend der Funktion von Slx5 als Ubiquitinligase, die auf SUMOylierte Proteine agiert, wird in Δslx5 vor allem die polySUMOylierte Form von Wss1 stabilisiert (siehe Abb. 39a und Abb. 39b). Die schnellere Degradation der nicht polySUMOylierten Wss1^{SIM} -Variante kann durch Δslx5 hingegen nicht supprimiert werden. Ebenso führt die Deletion des SIMs in der Pd-Variante dazu, dass die Deletion von *SLX5* keinen Einfluß mehr auf die Halbwertszeit von Wss1 hat. Dies spricht dafür, dass die vorhergehende polySUMOylierung von Wss1 wichtig ist für den Slx5-abhängigen Abbau von Wss1. Auch die Y2H-Interaktion von Wss1 mit Slx5 legt nahe, dass Wss1 Slx5-abhängig reguliert werden könnte. Um letztendlich sicher sagen zu können, dass Wss1 *in vivo* Slx5-abhängig degradiert wird, müsste jedoch

die Ubiquitylierung der SUMOylierten Form von Wss1 noch genauer untersucht werden.

Alles in allem lässt sich sagen, dass die wichtigen Signalwege der SUMOylierung und der Ubiquitylierung eng miteinander verbunden sind. Im Rahmen dieser Arbeit konnten dabei mehrere neue Faktoren identifiziert werden, die an der Schnittstelle dieser zwei Wege eine Rolle spielen. So scheint Cdc48 mit seinen Kofaktoren Wss1 und Tdp1 speziell beim SUMO-abhängigen Protein-Abbau zusammenzuwirken. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Cdc48-Kofaktor Wss1 höchstwahrscheinlich proteolytisch auf polySUMOylierte Proteine agiert, die zuvor von Slx5/Slx8 ubiquityliert wurden. So führt die Ubiquitylierung der SUMO-Substrate zur Rekrutierung von Cdc48 und damit auch Wss1. Um proteolytisch auf SUMO-Substraten wirken zu können ist daher neben der Protease-Aktivität auch die Interaktion mit Cdc48 essentiell für die Funktion von Wss1. Als mögliche Wss1-Substrate für diesen SUMO-abhängigen Abbau konnten die Proteine Rad52 und Top1 identifiziert werden. Im Zusammenhang mit Top1 wurde zudem Tdp1 als neuer Kofaktor von Cdc48 identifiziert und beschrieben. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass Tdp1 auf SUMOyliertes Top1 agiert und hierbei sowohl mit Wss1 zusammen oder aber unabhängig von diesem auf SUMOyliertes ubiquityliertes Top1 wirken könnte. Zudem scheint es, als ob Cdc48 generell eine Rolle beim Abbau von polySUMOylierten Proteinen spielen könnte.

Die im Rahmen der Doktorarbeit präsentierten Daten unterstreichen somit, dass der Protein-Abbau auch SUMOylierungs-abhängig reguliert werden könnte und dass bei der anschließenden Degradation von SUMO-Substraten mehreren Komponenten aus dem Ubiquitylierungsweg eine wichtige Rolle zukommt.

4. Material und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Für die Durchführung der Versuche wurden, falls nicht anders angegeben, analysereine Chemikalien und Reagenzien der Firmen Sigma -Aldrich, Applied Biosystems, Biomol, Biorad, Difco, Fluka, Invitrogen, Kodak, Merck, Roth, Riedel de Haen, Serva verwendet. Molekularbiologische Reagenzien, Restriktionsendonukleasen und die Mehrzahl anderer Enzyme wurden, soweit nicht anders vermerkt, von der Firmen Roche, MBI, New England Biolabs, Pharmacia und Promega bezogen. In den überwiegenden Fällen wurden sterile Gefäße und Lösungen sowie ausschließlich deionisiertes Wasser verwendet.

4.1.2 Computeranalysen

Datenbankrecherchen, u.a. Sequenzsuchen und- vergleiche sowie Literatur-suchen wurden mit den folgenden Internetdiensten durchgeführt:

Yeastgenome Database (<http://www.yeastgenome.org>), SwissProt (<http://www.expasy.ch>), Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PUBMED>), SMART (<http://www.smart.embl-heidelberg.de>) und Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Für Sequenzanalysen, Oligonukleotid-design, Erstellen von Restriktionskarten, Auswertung von DNA-Sequenzierungen und Vergleiche von Proteinsequenzen wurde das Programmpaket DNA-Star (DNA-Star Inc.) benutzt. Röntgenfilme und Gelphotographien wurden mittels eines Agfa Scanners (Duoscan 1200) und dem Programm Adobe Photoshop CS3 (Adobe System Inc.) digitalisiert. Weitere Graphiken und Abbildungen wurden mit dem Adobe Photoshop CS3 oder Microsoft Powerpoint erstellt. Textverarbeitung erfolgte auf einem Apple Macbook Pro.

4.1.3 Antikörper

Für Westernblots wurden folgende sekundäre, Peroxidase gekoppelte Antikörper eingesetzt: polyklonaler anti-Hase (Dianova) und polyklonaler anti-Maus (Dianova) aus der Ziege sowie polyklonaler anti-Ziege Antikörper aus dem Esel.

Des Weiteren wurden als primäre Antikörper verwendet: monoklonaler Maus anti-PGK-1 Antikörper (Molecular Probes), polyklonaler Hase anti-SMT3 Antikörper (Arbeitsgruppe Jentsch), polyklonaler Hase anti-Rad52 Antikörper (Arbeitsgruppe Jentsch), polyklonaler Hase anti-Cdc48 Antikörper (Arbeitsgruppe Jentsch), polyklonaler Hase anti-Shp1 Antikörper (Arbeitsgruppe Jentsch), polyklonaler Hase anti-Ufd1 Antikörper (Arbeitsgruppe Jentsch), monoklonaler Maus anti-myc Antikörper (Santa Cruz), monoklonaler Maus anti-HA (Arbeitsgruppe Jentsch), polyklonaler anti-Ubiquitin Antikörper (Santa Cruz) und polyklonaler, Peroxidase gekoppelter, anti-Protein A (Dako) Antikörper.

4.1.4 Escherichia coli-Stämme

XL1-Blue	sup E44, hsd R17, rec A1, gyr A46, thi, rel A1, lac-, F' [pro B+ , lac I q, Lac ZM15, Tn10 (tet r)] von Stratagene
----------	--

BL21 pRIL (DE3)	BF-, ompT, hsdS($r_B^- m_B^-$) dcm ⁺ , Tet ^r , gal, endA, Hte
-----------------	---

4.1.5 Escherichia coli –Vektoren

peT21d (Novagen)

pGex4TK (Amersham)

petM14

4.1.5 Medien und Anzucht von E.coli

LB-Medium: 1 % Trypton (Difco)
0,5 % Hefeextrakt (Difco)
1 % NaCl

LB-Agar: LB-Medium mit 1,5 % Agar

Den aufgeführten Medien wurde je nach Ansatz und Selektion Antibiotika mit folgenden Konzentrationen zugesetzt: Ampicillin 100 µg/ µl bzw. Chloramphenicol 34 µg/ µl

E. coli in Flüssigkultur, sowie Agarplatten wurden bei 37°C inkubiert. Die Dichte der Kulturen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm mit einem Eppendorf Photometer bestimmt.

Zur kurzfristigen Lagerung wurden Agarplatten bei 4°C aufbewahrt. Zur langfristigen Aufbewahrung wurden stationäre Flüssigkulturen mit Glycerol, Endkonzentration 16,7 %, versetzt und bei -80°C eingefroren.

4.1.6 *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Wenn nicht anders angegeben, sind alle Stämme isogen zu DF5 (Finley et al., 1987)

Y0002	MAT α , isogen zu DF5 (Finley et al., 1987) <i>his3-Δ200 leu2-3 2-112 lys2-801 trp1-1 (am), ura3-52</i>
Y0003	MAT α
Y0233	<i>Δubc9::TRP1 ubc9-1::LEU2, bar1::HIS3</i> MAT α (Susan Smith)
Y0306	<i>ufd1-2::LEU2</i> MAT α (Stephan Schlenker)
Y0554	W303 <i>cim3-1</i> MAT α (Thomas Meyer)
Y0649	<i>cdc48-6</i> MAT α (K.U.-Fröhlich)
Y0843	<i>Δshp1::KANMX6</i> MAT α (Schuberth et al., 2004)

Y1094	Δ smt3::HISMX6 YiP211- P_{ADH}^{7HIS} SMT3 MAT α (Carsten Hoege)
Y1204	Δ rad52::URA3 MATa (Hoege et al., 2002)
Y1915	Δ rad23::KANMX6 Δ rpn10::HIS3MX6 MAT α (Sebastian Rumpf)
YCH172	Δ ulp2::KANMX6 MAT α (Carsten Hoege)
YCH418	smt3-331 MATa (Biggins et. al., 2001)
YBP390	W303, leu2-112::URA3::leu2-k (Sacher et la.,2006)
PJ69-7a	trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4, gal80 GAL1::HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ MATa (James et al., 1996)
YMIS007	cdc48-6 Δ wss1::NATMX6 MATa
YMIS008	Δ shp1::KANMX6 Δ wss1::NATMX6 MATa
YMIS009	ufd1-2 Δ wss ::NATMX6 MATa
YMIS010	Δ wss1::NATMX6 MATa
YMIS011	Δ wss1::NATMX6 MAT α
YMIS013	Δ tdp1::KANMX6 Δ wss1::NATMX6 MATa
YMIS030	Δ mre11::KANMX6 MATa
YMIS032	Δ mre11::KANMX6 Δ wss1::NATMX6 MATa
YMIS034	Δ rad50::HISMX6 MATa
YMIS036	Δ rad50::HISMX6 Δ wss1::NATMX6 MATa
YMIS038	Δ ufd2::LEU2 MATa
YMIS040	Δ ufd2::LEU2 Δ wss1::NATMX6 MATa
YMIS042	Δ ulp2::KANMX6 Δ wss1::NATMX6, MAT α
YMIS050	Δ ulp2::KANMX6 Δ tdp1::NATMX6 MAT α
YMIS092	Δ rad52::URA Δ wss1::NATMX6 MATa
YMIS098	Δ top1::HIS3MX6 Δ wss1::NATMX6 MATa
YMIS099	Δ top1::HIS3MX6 MATa
YMIS101	Δ top1::HIS3MX6 Δ tdp1::KANMX6 MATa
YMIS103	Δ top1::HIS3MX6 Δ tdp1::KANMX6 Δ wss1::NATMX6 MATa
YMIS107	Δ top1::HIS3MX6 Δ ulp2::KANMX6 MATa

YMIS108	$\Delta top1::HIS3MX6 \Delta ulp2::KANMX6 \Delta wss1::NATMX6$ MATa
YMIS122	top1::ProteinA::KANMX6 MATa
YMIS123	top1::ProteinA::KANMX6 $\Delta wss1::NATMX6$ MATa
YMIS237	$\Delta siz1::HIS3MX6 siz2::HIS3MX6$ MATa
YMIS238	W303 <i>cim3-1</i> $\Delta wss1::NATMX6$ MAT α
YMIS302	$\Delta siz1::HIS3MX6 siz2::HIS3MX6 \Delta wss1::NATMX6$ MAT α
YMIS303	$\Delta rad23::KANMX6 \Delta rpn10::HIS3MX6 \Delta wss1::NATMX6$ MAT α
YMIS304	$\Delta rpn10::HIS3MX6 \Delta wss1::NATMX6$ MAT α
YMIS306	$\Delta rad23::KANMX6 \Delta wss1::NATMX6$ MAT α
YMIS308	$\Delta rpn10::HIS3MX6$ MAT α
YMIS310	$\Delta rad23::KANMX6$ MATa
YMIS311	$\Delta ubc9::TRP1 ubc9-1::LEU2 bar1::HIS3 wss1::NATMX6$ MATa
YMIS313	$\Delta slx5::KANMX6 \Delta wss1::NATMX6$ MATa
YMIS327	<i>tdp1::6HA::NATMX6</i> MATa
YMIS373	$\Delta smt3::HISMX6 YiP211-P_{ADH}^{7HIS}SMT3 \Delta wss1::NATMX6$ $\Delta slx5::HPHNT$ MAT α
YMIS383	$\Delta slx8::HPHNT \Delta wss1::NATMX6$ MATa
YMIS390	<i>cdc48-6 tdp1::6HA::NATMX6</i> MATa
YMIS422	$smt3::HISMX6 YiP211-P_{ADH}^{7HIS}SMT3 \Delta wss1::NATMX6$ MAT α
YMIS433	<i>YiP211-PGAL-Ubi-Pro-β-Gal</i> MATa
YMIS434	<i>YiP211-PGAL-Ubi-Pro-β-Gal wss1::NATMX6</i> MATa
YMIS527	$\Delta ulp2::KANMX6 \Delta wss1::NATMX6 \Delta slx5::HPHNT$ MAT α
YMIS528	$\Delta shp1::KANMX6 \Delta slx5::HPHNT$ MATa
YMIS535	<i>ufd1-2</i> $\Delta slx5::HPHNT$ MATa
YMIS537	$\Delta ufd2::LEU2 \Delta slx5::HPHNT$ MATa
YMIS540	$smt3::HISMX6 YiP211-P_{ADH}^{7HIS}SMT3 top1::ProteinA::KANMX6$ MAT α

YMIS541	$\Delta smt3::HISMX6$ $YiP211-P_{ADH}^{7HIS}SMT3$ $top1::ProteinA::KANMX6 \Delta wss1::NATMX6 MAT_{\alpha}$
YMIS546	$\Delta smt3::HISMX6$ $YiP211-P_{ADH}^{7HIS}SMT3 top1::KANMX6$
YMIS547	$\Delta smt3::HISMX6$ $YiP211-P_{ADH}^{7HIS}SMT3 top1::KANMX6$ $\Delta wss1::NATMX6$
YMIS669	$\Delta ulp2::KANMX6 \Delta wss1::NATMX6, \Delta slx8::HPHNT MAT_{\alpha}$
YMIS670	$\Delta ulp2::KANMX6 top1::ProteinA::KANMX6 MAT_{\alpha}$
YMIS671	$\Delta ulp2::KANMX6 \Delta wss1::NATMX6 top1::ProteinA::KANMX6$ MAT_{α}
YMIS674	$\Delta ulp2::KANMX6 smt3::HISMX6, YiP211-P_{ADH}^{7HIS}KKK-SUMO$ MAT_{α}
YMIS675	$\Delta ulp2::KANMX6 \Delta wss1::NATMX6 \Delta ris::KANMX6 MAT_{\alpha}$
YMIS677	$\Delta ulp2::KANMX6 smt3::HISMX6, YiP211-P_{ADH}^{7HIS}KKK-SUMO$ $\Delta wss1::NATMX6 MAT_{\alpha}$
YMIS694	$NATMX6::P_{ADH}::3HA::TOP MAT_{\alpha}$
YMIS751	$\Delta slx5::HPHNT \Delta wss1::NATMX6 tdp1::KANMX6 MAT_{\alpha}$
YMIS752	$\Delta siz1::HIS3MX6 siz2::HIS3MX6 \Delta wss1::NATMX6$ $tdp1::KANMX6 MAT_{\alpha}$
YMIS770	$\Delta ulp2 ::KANMX6 \Delta tdp1::HPHNT top1::HISMX6$

4.1.7 *Saccharomyces cerevisiae*-Vektoren

pGAD424 (Bartel et al., 1993)

pGBT9 (Bartel et al., 1993) Δ

pYEplac (Gietz und Sugino, 1988)

pYc (Gietz und Sugino, 1988)

pYip (Gietz und Sugino, 1988)

4.1.8 Verwendete Plasmide

soweit nicht anders angegeben, in dieser Arbeit hergestellt

<u>Name</u>	<u>Verwendungszweck</u>
$YIP128-P_{WSS1}-WSS1^{3HA}-T_{WSS1}$	Expression von HA-markiertem Wss1 unter eigenem Promotor
$YIP128-P_{WSS1}-WSS1^{3HA} H115A-T_{WSS1}$	Expression einer HA-markiertem Wss1-Mutante unter eigenem Promotor
$YIP128-P_{WSS1}-WSS1^{3HA} SIM-T_{WSS1}$	Expression einer HA-markiertem Wss1-Mutante unter eigenem Promotor
$YIP128-P_{WSS1}-WSS1^{3HA} ShpBox-T_{WSS1}$	Expression einer HA-markiertem Wss1-Mutante unter eigenem Promotor
$YIP128-P_{WSS1}-WSS1^{3HA} AA-T_{WSS1}$	Expression einer HA-markiertem Wss1-Mutante unter eigenem Promotor
$YIP128-P_{WSS1}-WSS1^{3HA} ShpBox-AA-T_{WSS1}$	Expression einer HA-markiertem Wss1-Mutante unter eigenem Promotor
$YEP195-P_{ADH}-^{3MYC}WSS1-T_{ADH}$	konstitutive Überexpression von Wss1
$YEP195-P_{ADH}-^{3MYC}WSS1 H115A-T_{ADH}$	konstitutive Überexpression von Wss1 H115A
$YEP195-P_{ADH}-^{3MYC}WSS1 SIM-T_{ADH}$	konstitutive Überexpression von Wss1 SIM
$YEP195-P_{ADH}-^{3MYC}WSS1 H115ASIM-T_{ADH}$	konstitutive Überexpression von Wss1 H115A SIM
$YEP195-P_{ADH}-^{3MYC}WSS1 ShpBox-T_{ADH}$	konstitutive Überexpression von Wss1 Shpbox
$Yc22-P_{WSS1}-WSS1^{3HA} -T_{WSS1}$	Expression vom HA-markiertem Wss1- unter eigenem Promotor
$Yc22-P_{WSS1}-WSS1^{3HA} H115A-T_{WSS1}$	Expression einer HA-markiertem Wss1-Mutante unter eigenem Promotor
$Yc22-P_{WSS1}-WSS1^{3HA} SIM-T_{WSS1}$	Expression einer HA-markiertem Wss1-Mutante unter eigenem Promotor
$Yc22-P_{WSS1}-WSS1^{3HA} ShpBox-T_{WSS1}$	Expression einer HA-markiertem Wss1-Mutante unter eigenem Promotor
$Yc22-P_{WSS1}-WSS1^{3HA} AA-T_{WSS1}$	Expression einer HA-markiertem Wss1-Mutante unter eigenem Promotor

<i>Yc22-P_{WSS1}-WSS1^{3HA} ShpBox-AA-T_{WSS1}</i>	Expression einer HA-markiertem Wss1-Mutante unter eigenem Promotor
<i>YIP128-P_{SMT3}-SMT3-331-β-GAL</i>	Expression einer linearen SMT3-331-β-GAL Fusion unter dem SMT3-Promotor
<i>YiP211-P_{ADH}-^{7HIS}SMT3</i>	konstitutive Überexpression von His markiertem Smt3 (Hoege et al., 2002)
<i>YiP211-P_{ADH}-^{7HIS}SMT3-331</i>	konstitutive Überexpression von His markiertem Smt3-331
<i>pGAD-WSS1</i>	Expression von AD-markiertem Wss1
<i>pGAD-WSS1^{Δ1-163}</i>	Expression von AD-markiertem Wss1 (R.Albang)
<i>pGAD-WSS1^{Δ1-163} SIM</i>	Expression der AD-markiertem Wss1 SIM-Mutante
<i>pGAD-Ubc9</i>	Expression von AD-markiertem Ubc9 (Hoege et al., 2002)
<i>pGAD-Siz1</i>	Expression von AD-markiertem Siz1 (Meik Sacher)
<i>pGAD-Siz2</i>	Expression von AD-markiertem Siz2 (Dipl.arbeit M. Schwarz)
<i>pGAD-SMT3^{GG}</i>	Expression von AD-markiertem SMT3 (Hoege et al.)
<i>pGAD-Ulp1</i>	Expression von AD-markiertem Ulp1 (B.Pfander)
<i>pGAD-Ulp2</i>	Expression von AD-markiertem Ulp2 (B.Pfander)
<i>pGAD-Slx5</i>	Expression von AD-markiertem Slx5 (S. Creton)
<i>pGAD-Ris1</i>	Expression von AD-markiertem Ris1 (S. Creton)
<i>pGAD-Cdc48</i>	Expression von AD-markiertem Cdc48(R.Albang)
<i>pGAD-Cdc48 N</i>	Expression der AD-markierten Cdc48-N-domäne (R.Albang)
<i>pGAD-Ufd1</i>	Expression von AD-markiertem Ufd1 (R.Albang)
<i>pGAD-Shp1</i>	Expression von AD-markiertem Shp1 (R.Albang)
<i>pGBD-WSS1</i>	Expression von BD-markiertem Wss1

<i>pGBD-WSS1 ShpBox</i>	Expression von BD-markiertem Wss1 ShpBox
<i>pGBD-WSS1 ShpBox AA</i>	Expression von BD-markiertem Wss1 ShpBox AA
<i>pGBD-SMT3^{GG}</i>	Expression von BD-markiertem <i>SMT3</i> (Hoege et al.)
<i>pGBD-Cdc48</i>	Expression von BD-markiertem Cdc48 (T.Hoppe)
<i>pGBD-Cdc48 N</i>	Expression der BD-markierten Cdc48-N-domäne (R.Albang)
<i>pGBD-Ufd2</i>	Expression von BD-markiertem Ufd2 (K.Jespen)
<i>pGBD-Tdp1</i>	Expression von BD-markiertem Tdp1
<i>pGBD-Rad6</i>	Expression von BD-markiertem Rad6 (H.Ulrich)
<i>pGBD-Rad18</i>	Expression von BD-markiertem Rad18 (H. Ulrich)
<i>pGBD-Rad51</i>	Expression von BD-markiertem Rad51 (Pfander et al., 2005)
<i>pGBD-Rad52</i>	Expression von BD-markiertem Rad52 (B.Pfander)
<i>pGBD-Rad52KKK (K10,11,220)</i>	Expression von BD-markiertem Rad52KKK (M.Sacher)
<i>YEP195-P_{ADH}-SMT3^{AA}-BD-T_{ADH}</i>	Konstitutive Expression von BD-markiertem Wss1
<i>pSEB21d-SMT3^{AA}-GST</i>	Rekombinantes C-terminal GST-markiertes SMT3 ^{AA} (Dipl.arbeit Michael Schwarz)
<i>pSEB-SMT3^{GG}-GST</i>	Rekombinantes C-terminal GST-markiertes SMT3 ^{GG}
<i>pGEX4T1-Cdc48</i>	GST-markiertes Cdc48 (Dr.arbeit Sebastian Rumpf)
<i>pGEX4T1-Cdc48 N</i>	GST-markiertes Cdc48 Fragment (Dr.arbeit Sebastian Rumpf)
<i>pGEX4T1-Cdc48 D1D2</i>	GST-markiertes Cdc48 Fragment (Dr.arbeit Sebastian Rumpf)
<i>pGEX4T1-TDP1</i>	Rekombinantes GST-markiertes Tdp1

4.1.9 Medien und Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae*

YPD-Medium	Bacto-Peptone (Difco) 1 % Bacto Yeast Extract (Difco) 2 % D-(+)-Glucose
YPD-Agar	YPD-Medium + 4 % (w/w) Bacto-Agar (Difco)
YPD G418 Platten	YPD-Medium auf 50°C abkühlen lassen, Zugabe von 200 mg/l G418
SC-Medium	0,67 % Hefe Stickstoff Basis ohne Aminosäuren 0,2 % Dropout-Lösung (autoklaviert) 2 % D-(+)-Glucose
SC-Platten	SC-Medium + 2 % (w/w) Bacto-Agar (Difco)
5-FoA-Platten	0,67 % Hefe Stickstoff Basis 0,2 % Dropout-Lösung mit allen Aminosäuren 2 % D-(+)-Glucose 2 % (w/w) Bacto-Agar 0,03 % Uracil auf 50°C abkühlen lassen, Zugabe von 1 g 5-FOA/ Liter

10 x Dropout-Lösungen:

L-Isoleucin	300 mg/l
L-Valin	1500 mg/l
L-Adenin Hemisulfat Salz	200 mg/l
L-Arginin	200 mg/l
L-Histidin Monohydrat	200 mg/l
L-Leucin	1000 mg/l
L-Lysin	300 mg/l
L-Methionin	200 mg/l
L-Phenylalanin	500 mg/l
L-Threonin	2000 mg/l
L-Tryptophan	200 mg/l
L-Tyrosin	300 mg/l
L-Uracil	200 mg/l
L-Glutamat	1000 mg/l
L-Aspartat	1000 mg/l
L-Serin	4000 mg/l

Für Selektionsmedien wurden die entsprechenden Aminosäuren weggelassen.

Saccharomyces cerevisiae in Flüssigkultur wurde bei 30°C geschüttelt sowie Platten bei 30°C inkubiert. Temperatursensitive Hefemutanten wurden bei RT inkubiert. Die Dichte der Kulturen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm mit einem Eppendorf Photometer bestimmt. Einer OD₆₀₀ von 1 entsprechen hierbei ungefähr 3×10^7 Zellen/ ml.

Zur kurzfristigen Lagerung wurden Agarplatten bei 4°C gelagert. Zur langfristigen Aufbewahrung wurden stationäre Flüssigkulturen mit Glycerol, Endkonzentration 16,7 %, versetzt und bei -80°C eingefroren.

4.2. Techniken mit *Escherichia coli*

4.2.1. Herstellung kompetenter Zellen

Verwendung fanden sowohl chemisch- als auch elektrokompetente Zellen. 1 Liter LB-Medium wurde mit 10 ml einer Übernacht-Kultur, der kompetent zu machenden Bakterien, angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 bei 37°C wachsen gelassen. Die nun folgenden Schritte fanden alle im Kühlraum bei 4°C statt und nur mit vorgekühlten Lösungen und Materialien. Die Zellen wurden für eine Stunde auf Eis abgekühlt und für 10 Minuten bei 5000 rpm und 4°C pelletiert.

Für die elektrokompetenten Zellen wurde das Pellet in 1 Liter sterilem Wasser resuspendiert, eine Stunde stehen gelassen, pelletiert und derselbe Schritt mit 500 ml 10 % Glycerin wiederholt. Das Pellet wurde mit 20 ml 10 % Glycerin gewaschen, abzentrifugiert, in 3 ml 10 % Glycerin aufgenommen und Aliquots a 100 µl bei -80°C eingefroren.

Bei den chemisch kompetenten Zellen wurde das Zellpellet in 200 ml 100 mM MgCl₂- Lösung vorsichtig resuspendiert, abzentrifugiert und in 400 ml 100 mM CaCl₂ aufgenommen. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Zellen in 20 ml 15% Glycerin mit 100 mM CaCl₂ resuspendiert und ebenfalls a 100 µl bei -80°C eingefroren.

4.2.2. Transformation von Bakterienzellen

Bakterien wurden durch Elektroporation oder chemisch durch Calciumchlorid transformiert

4.2.2.1 Transformation elektrokompeter Zellen

Hierfür wurden 25 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit ca. 300 ng Plasmid bzw. 1 bis 2 µl einer Ligationsreaktion (siehe 5.4.3.3) versetzt und transformiert. Dazu wurden 20 µl der Suspension in eine Elektroporationsküvette pipettiert und mit einem Impuls von 1,8 kV und 25 µF bei 200 Ω Widerstand (Biorad Elektroporator) elektroporiert. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium und Transfer in ein Eppendorfgefäß wurden die Zellen bei 37°C 60 Minuten bei 200 rpm geschüttelt. Anschließend wurde auf entsprechendem Selektionsmedium ausplattiert und bei 37°C über Nacht wachsen gelassen.

4.2.2.2 Transformation chemischkompetenter Zellen

Zur Transformation von ca. 300 ng Plasmid wurden 30 µl chemisch kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut und für 30 Minuten mit der DNA auf Eis inkubiert. Für den Hitzeschock wurden die Zellen 90 s lang in einen 42°C warmen Heizblock transferiert, mit 1 ml LB-Medium versetzt und für 1 Stunde bei 37°C geschüttelt. Der Transformationsansatz wurde dann auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum zur Selektion ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

4.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Je 4 ml einer Übernacht-Kultur der Zellen, die das gewünschte Plasmid trugen, wurden in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und bei 10.000 g für 1 Minute abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Plasmid-DNA mittels des Nucleospin Plasmid Quick Pure-Kits (Machery-Nagel) den Herstellerangaben entsprechend isoliert. Dies resultierte in 300 bis 500 ng/ µl DNA pro Kultur.

4.2.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Bestimmung der Konzentration erfolgte photometrisch mit einem Eppendorf Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm. Hierbei nutzt man die Tatsache, dass die Nukleinsäuren ultraviolettes Licht mit Wellenlängen zwischen 250 und 270 nm absorbieren. Die Absorptionsmaxima der verschiedenen Basen unterscheiden sich, liegt jedoch im Mittelwert bei 260 nm. Die Absorption ist nach dem Lambert-Beerschen Gesetz proportional zur Konzentration der absorbierenden Substanz in Lösung. Alle Proben wurden vor der Messung 1:100 in Wasser verdünnt. Bei einer OD von 1,0 wurde eine Konzentration der Proben von 50 µg/ ml dsDNA angenommen.

4.2.5 Expression rekombinanter Proteine

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene rekombinante Proteine mit GST-Fusionsanteil in *E. coli* transformiert und für präparative Zwecke exprimiert.

10 ml einer Übernacht -Kultur in LB_{Amp/Chl} wurde in 1 Liter LB_{Amp/Chl} verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 geschüttelt. Die Expression der rekombinanten Proteine erfolgte durch Zugabe von IPTG (1mM Endkonzentration) und Inkubation für 3 bis 5 Stunden bei RT, 30°C bzw. 37°C, je nach optimaler Temperatur. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, schockgefroren und bei -80°C bis zur Aufreinigung der Proteine aufbewahrt.

4.2.6 Reinigung rekombinanter Proteine

4.2.6.1 Reinigung von GST-gekoppelten Proteinen

Die Reinigung von rekombinanten Proteinen mit GST-Fusionsanteilen erfolgte mittels Affinitäts-Chromatographie unter Verwendung von Glutathion-Sepharose (Pharmacia).

Dazu wurde das schockgefrorene Pellet langsam auf Eis aufgetaut, in 20 ml

Resuspendierungspuffer aufgenommen und 30 Minuten bei 4°C auf einem Taumelschüttler gerollt. Der Zellaufschluss erfolgte mittels 2 minütigem Sonifizieren in 50 % Intervallen. Der Aufschluss wurde mit Triton-X-100 (Endkonzentration 1 %) versetzt, wiederum 30 Minuten gerollt und 30 Minuten bei 20800g pelletiert. Glutathion-Sepharose, welche vorher zweimal mit PBS gewaschen worden war, wurde anschließend 3 Stunden mit dem Überstand inkubiert. Danach wurde einmal mit 20 ml Waschpuffer A, zweimal mit Waschpuffer B und einmal mit PBS gewaschen. Das gereinigte Protein wurde durch Zugabe von 4 x 2 ml GST-Elutionspuffer eluiert und über Nacht gegen das 20 fache Volumen PBS in einem Dialyseschlauch dialysiert.

4.2.6.2 Denaturierende Reinigung von rekombinantem Wss1-Protein

Da Wss1 ausschließlich denaturierend aufgereinigt werden konnte wurde es ohne Tag kloniert, da der His tag mit sich selber interagieren kann, und denaturierend aufgereinigt. Dazu wurde Wss1 in E.coli exprimiert, die Inklusions *bodies* mit dem Wss1 Protein aufgereinigt, und das Wss1-Protein sequentiell zurückgefalten. Die Aufreinigung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Max-Planck Core Facility.

Die Inklusions *bodies* wurden in 8 M Urea aufgereinigt, und das Protein anschließend, gegen eine denaturierende Urea-Lösung, in absteigender Konzentration, für jeweils 6 bis 24 Stunden dialysiert und zurückgefalten (8M, 4M, 2M, 1M Urea respective). Das Wss1 Protein wurde über eine Hi Load Superdex 75 Säule gelfiltriert, in Gelfiltrationspuffer (100mM NaCl, Tris pH 7,5) aufgenommen und das eluierte Protein per Massenspektrometrie kontrolliert.

4.3. Techniken mit *Saccharomyces cerevisiae*

4.3.1 Allgemeine Methoden

4.3.1.1 Herstellung kompetenter Zellen

Aus einer Übernacht-Kultur in YPD-Medium wurde auf eine $OD_{600} = 0,05 - 0,1$ angeimpft und bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, mit 0,1 bis 0,5 Volumen sterilem Wasser sowie mit 0,1 bis 0,2 Volumen SORB gewaschen und die Zellen in 360 µl SORB pro 50 ml Zellkultur aufgenommen. Nach Zugabe von 40 µl denaturierter Einzelstrang Lachs-Sperma-DNA, als Träger DNA, wurden Aliquots zu 50 µl bei - 80°C eingefroren.

4.3.1.2 Transformation von kompetenten Hefezellen

Dabei wurden pro zu transformierender Plasmid-DNA 10 µl und im Fall einer Transformation zur Gendeletion 50 µl bzw. 75 µl zur Epitop -Markierung an kompetenten Zellen eingesetzt. Diesem Ansatz wurden 6 Vol. PEG zugegeben, gevortext und bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von DMSO (10 % Endkonzentration) wurden diese für 15 Minuten bei 42°C leicht geschüttelt (600rpm) und abzentrifugiert (3 Minuten bei 400g). 100 µl steriles Wasser wurden zupipettiert und die Zellen auf Selektionsmedium ausplattiert.

4.3.1.4 Isolierung von Plasmid –DNA durch alkalisch/ mechanisch Lyse

Die erfolgreiche Deletion von Genen wurde mittels Einzelkolonie -PCR bestätigt. Die Isolierung der DNA erfolgte hierbei durch alkalische Lyse.

Eine Einzelkolonie wurde dazu in 20 µl 0,02 N NaOH aufgenommen, mit Glassperlen bis zum Meniskus versetzt und für 5 Minuten im Thermomixer bei 100°C geschüttelt (1400 rpm). Nach kurzem Abzentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit wurden 4 µl des Überstands als Ausgangs-DNA (Template) eingesetzt.

4.3.1.5 Kreuzung von Hefestämmen

Hierbei bedient man sich der Tatsache, dass Hefezellen mit unterschiedlichem Konjugationstyp (MAT a und MAT α) zu diploiden Zellen fusionieren können. Durch

gezielte Auswahl der Ursprungsstämme lassen sich so Hefezellen mit spezifischen genetischen Eigenschaften, durch Neukombination der Allele, herstellen.

Zwei Hefestämme mit unterschiedlichem Konjugationstyp (MAT a und MAT α) wurden jeweils in YPD-Medium über Nacht inkubiert. Die Zellkulturen wurden verdünnt und bis zur logarithmischen Wachstumsphase inkubiert. Aliquots der gleichen Zellmenge wurden gemischt und je 10 μ l auf eine YPD-Platte ausgetüpfelt. Da beide Ursprungsstämme der diploiden Zellen unterschiedliche Marker trugen, wurden die Kreuzungen durch Überstempeln auf die jeweiligen Selektionsmedien getestet.

4.3.1.6 Tetradenanalyse

Bei dieser Methode werden diploide Zellen zur Sporulation angeregt und die Sporen anschließend mit Hilfe eines Mikromanipulators separiert.

Diploide Hefezellen (500 μ l) einer stationären Kultur, die mehr als 24 Stunden in YPD oder SC-Medium gewachsen sind, wurden pelletiert, mehrmals mit sterilem Wasser gewaschen und in 4 ml Sporulationsmedium aufgenommen. Nach dreitägiger Sporulation bei RT wurden 10 μ l der sporulierten Zellen mit 10 μ l Zymolase 20 T-Lösung gemischt und 10 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen am Rande einer YPD-Platte aufgetropft, durch leichte Kippen entlang des Durchmessers der Platte verteilt und mit einem Mikromanipulator (Singer MSM-System) ausgelegt. Das Wachstum der Sporen erfolgte für mehrere Tage bei RT.

4.3.1.7 Testen des Konjugationstyps

Um nach der Sporulation den Konjugationstyp bestimmen zu können, werden die zu bestimmenden Hefezellen auf eine YPD-Platte übergestempelt, die mit einer dünnen Agaroseschicht mit einem Teststamm eines bestimmten Konjugationstyps überschichtet ist.

Wenn der Teststamm einen anderen Konjugationstyp besitzt als die übergestempelte Kolonie kommt es zur Ausbildung eines Halo um die zu testende

Kolonie, d.h. in einem gewissen Bereich um diese Kolonie herum kann der Teststamm nicht wachsen.

Dazu wurde jeweils eine Kolonie der Teststämme RH 448a (MAT a) oder RC 75-7 (MAT α) in 1ml sterilem H₂O resuspendiert. Jeweils 50 μ l der Suspension wurden zu 5 ml geschmolzener 1 % Agarlösung, welche auf 45°C abgekühlt war, gegeben, vermischt und auf einer YPD-Platte gegossen. Nach Überstempeln, der zu testenden Kulturen, auf diese Platten wurden diese ein bis zwei Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bestimmung des Konjugationstyps erfolgte wie oben beschrieben.

4.3.1.8 Erstellen von Verdünnungsreihen

Um unterschiedliche Hefemutanten phänotypisch miteinander vergleichen zu können, wurden serielle Verdünnungsreihen erstellt und auf Temperatursensitivitäten getestet. Durch das Austüpfeln bestimmter Zellzahlen kann man eine zuverlässigere Aussage treffen als durch einfaches Ausstreichen.

Zellen aus einer Übernacht -Kultur in YPD- oder Selektivmedium wurden verdünnt und nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase mit sterilem H₂O auf eine OD₆₀₀ von 0,5 eingestellt. Dies entspricht etwa $1,5 \times 10^7$ Zellen. Fünf weitere Verdünnungen von 1:5 wurden pipettiert und von den insgesamt 6 Verdünnungen je 5 μ l in Reihe ausgetüpfelt. Anschließend wurde zu den gewählten Bedingungen 3 bis 4 Tage inkubiert.

4.3.2 Spezielle Methoden

4.3.2.1 Das Hefe-Zwei-Hybrid-System

Dieses System wurde zum Nachweis der Interaktion von bestimmten Proteinen eingesetzt.

Das zu untersuchende Protein wird dabei zusammen mit der GAL4-Aktivierungs- oder der GAL4 -DNA-Bindedomäne fusioniert. Der potentielle Interaktionspartner enthält das jeweilige andere Fragment des GAL4-Transkriptionsaktivators. Bei

eintretender Wechselwirkung der zwei Proteine und Bindung an die Promotor-Sequenzen von GAL4-aktivierbaren Genen (UAS_{GAL}) kommt es dadurch zur Expression von Reportergenen. Als Reportergene wurden die Gene *HIS3* und *ADE2* des Hefestamms PJ69-7a verwendet. Diese erlauben das Erkennen von möglichen Interaktionen durch Ausplattieren auf die entsprechenden Selektionsmedien, wobei zur Induktion des *ADE2* Gens eine stärkere Interaktion der zwei Bindepartner notwendig ist.

4.3.2.1.1 Nachweis einer Y2H-Interaktion

Dazu wurde der Hefestamm PJ69-7a mit ca. 300ng DNA der zu testenden Proteine transformiert und auf Selektionsmedium ausplattiert. Zur Kontrolle wurde das zu testende Protein zusammen mit dem entsprechenden Leervektor transformiert. Nach drei Tagen wurden mögliche Interaktionen durch Austüpfeln auf Selektionsplatten, ohne Adenin bzw. Histidin, nachgewiesen.

4.3.2.2 Integrative Transformation über homologe Rekombination

In Hefezellen ist es möglich Gene durch homologe Rekombination zu deletieren bzw. *in vivo* mit Epitopen, z.B. Protein A, zu markieren. Dabei wird in beiden Fällen eine PCR-Produkt transformiert (Knop et al. ,1999).

4.3.2.2.1 Zum Epitop-Markieren von Proteinen

Zum Epitop-Markieren wird mittels PCR eine Markierungskassette, die neben dem gewählten Epitop zusätzlich ein Resistenzgen sowie einen Terminator enthält, amplifiziert.

Hierzu wurden Oligonukleotide synthetisiert, welche je circa 50 Basenpaare mit dem C-Terminus ohne Terminator bzw. mit dem 3' untranslatierten Bereich des zu markierenden ORFs homolog waren. Beide Primer besitzen zusätzlich je eine Standardsequenz mit welcher die Markierungskassette amplifiziert werden kann. Das erhaltene PCR-Produkt wurde anschließend transformiert (siehe 5.3.1.2) und die Epitop Markierung immunologisch nachgewiesen.

4.3.2.2.2 Zur Disruption von Genen

Die Deletion von Genen beruht auf demselben Schema wie die Epitop-Markierung. Hierzu wurden die Primer jedoch so gewählt, dass sie eine 50 Basenpaarlange Homologie mit der Sequenz vor dem Startcodon bzw. nach dem Stopcodon des gewählten Gens aufwiesen. Der Nachweis der Gendeletion erfolgte über PCR-Analyse.

4.3.2.3 Roboter-basierte genetische Untersuchung von $\Delta wss1$

Zur genauen Identifizierung der Wss1-Funktion wurde ein genetischer Letalitäts-*screen* durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde *WSS1* durch eine NAT-Kassette in einem haploiden Stamm ersetzt und somit deletiert. Durch Einbringen der NAT-Kassette kann dieser Hefestamm auf Hefeplatten, mit dem Antibiotikum Nourseothricin supplementiert, wachsen. Um genetische Interaktionen zu identifizieren wurde dieser Stamm mit einer Kollektion an haploiden Hefedeletionsmutanten gekreuzt. Diese Kollektion besitzt ungefähr 5000 Mutanten (durch eine KAN-Resistenz markiert), die als Duplikate auf Kulturplatten mit 384-Einzelkolonien vorliegen. Alle nachfolgenden Schritte wurden automatisiert mit Hilfe einer Bio-mek FX-Arbeitsstation von Beckmann Coulter durchgeführt. Genaue Beschreibung siehe Tong et al.

zur Durchführung des *screens* wurden die 5000-Deletionsmutanten auf den zu untersuchenden *knock-out* Stamm (in dem Fall $\Delta wss1$) mit Hilfe eines Stempels übertragen und für 2 Tage bei 30°C inkubiert. Diploide Stämme wurden anschließend durch Selektion auf SC-Platten+KAN+NAT selektioniert und auf ein spezielles Sporulationsmedium übertragen. Nach 12-16 tägiger Sporulation wurde zweifach auf haploide Stämme durch Replikaplattierung selektioniert. Die finale Selektion der haploiden Doppeldeletionsmutanten erfolgte durch das Replika plattieren auf SC+KAN und nachfolgendem Plattieren auf SC+KAN+NAT. Letale Interaktoren von $\Delta wss1$ zeichneten sich dadurch aus, dass sie auf SC+KAN-Platten wuchsen, nicht jedoch auf den SC+KAN*NAT-Platten.

4.3.2.4 Bestimmung der Rekombinationsraten

Zur Bestimmung des Einflusses einer *Wss1*-Deletion bzw. der Überexpression von *Wss1* und der Pd-Variante auf die Rad52-abhängige Rekombination wurde ein *direct repeat assay* durchgeführt. In diesem Testsystem (Hefestamm YBP390) liegen zwei nicht-funktionale *LEU2*-Heteroallele, getrennt von einem funktionalem *URA3*-Gen, auf einem DNA-Strang. Durch rekombination kann das WT-Allel von *LEU2* entstehen, wodurch die Zellen wieder in der Lage sind auf SC-Leu-Platten zu wachsen. Je nach Wachstum auf SC-Ura-Platten kann man zusätzlich noch Gendeletionen (ura-) und Genkonversionen (ura+) unterscheiden (Palladino und Klein, 1992).

Allgemein wurde die Rekombinationsrate mit Hilfe eines Fluktuationstests untersucht (Sacher et al., 2006). Zur Bestimmung der Rekombinationsrate wurde eine Kultur mit einer geringen Zellzahl (1:20.000 Verdünnung einer Übernachtskultur) inokuliert und bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde auf YPD-Platten zur Bestimmung der Zellzahl ausplattiert, sowie der andere auf den entsprechenden SC-Platten. Die Platten wurden für 3 Tage bei 30°C inkubiert. Für jeden untersuchten Stamm wurden 10 unabhängige Kulturen benutzt.

4.4. Molekularbiologische Methoden

4.4.1 Agarosegel-Elektrophorese

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 0,8- 1,5% (w/v), je nach Größe der aufzutrennenden DNA, verwendet. Um die DNA sichtbar zu machen, wurde zu jedem Gel Ethidiumbromid gegeben, welches in die DNA interkaliert und bei Anregung durch UV-Licht fluoresziert. Auf diese Weise lässt sich eine DNA-Bande im Gel ab einer Konzentration von ca. 5 ng sichtbar machen.

Nach dem Abwiegen der entsprechenden Menge Agarose wurde diese in 1x TBE-Puffer durch Erhitzen gelöst. Nach vollständiger Homogenisierung der Lösung wurde Ethidiumbromid bis zu einer Endkonzentration von 0,2 µg/ ml zugegeben. Die

Lösung wurde in vorbereitete Flachkammern mit Kämmen für die Geltaschen gegossen, wo sie bei RT auspolymerisierte. Danach wurde die Schale in eine Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit 1x TBE-Puffer aufgefüllt, bis das Gel vollständig bedeckt war.

Die DNA-Proben wurden mit 1/5 Volumen 5x Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen geladen. Zusätzlich wurde jedes Mal ein Größenmarker (1kb DNA-Ladder, Invitrogen) mitaufgetragen, um die Größe der Fragmente bestimmen zu können. Die Auftrennung erfolgte je nach Gelkonzentration und Fragmentlänge der Fragmente bei 100-120 mV innerhalb von 30 bis 60 Minuten. Zur Dokumentation und Auswertung wurde die aufgetrennte DNA durch UV-Illumination sichtbar gemacht, mit einer Kamera aufgenommen und auf Thermopapier (Mitsubishi) ausgedruckt.

4.4.2 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die spezifischen DNA-Fragmente wurden im Gel, mittels Anregung durch UV-Licht sichtbar gemacht, mit einem Skalpell ausgeschnitten und nach Angaben des Herstellers mit einem QIAquick Gel Extraktion Kit (Quiagen) eluiert.

4.4.3 Fällern von DNA

Zum Aufkonzentrieren der DNA wurde diese mittels Alkohol-Fällung gefällt. Dazu gibt man zu der Nukleinsäurelösung ein monovalentes Salz und wäscht anschließend mit Alkohol.

Zur DNA-Lösung wurden 1/10 Volumen 3 M NaAc (pH 4,6), sowie 2,5 Vol. Ethanol zugegeben, bei -20°C für 30 Minuten inkubiert und für 30 Minuten bei RT abzentrifugiert (13000 rpm). Nach Abnehmen des Überstandes und Trocknen der DNA wurde diese in 10 µl ddH₂O aufgenommen.

4.4.4 PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Technik zur Amplifizierung von DNA-Sequenzen. Im Rahmen der Doktorarbeit wurde diese Methode für verschiedene Zwecke eingesetzt.

4.4.4.1 PCR zur Amplifikation von DNA

Alle PCR-Reaktionen wurden in einem Eppendorf Mastercycler durchgeführt, wobei der Standardansatz 50 µl betrug. Eingesetzt wurden jeweils 50 ng DNA, 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, sowie 0,2 -0,5 u Polymerase (Taq, Taq/ Vent-Mischung 4:1 oder Pfu-Turbo, Stratagene) im jeweiligen 1x PCR-Puffer (Spezialpuffer der jeweiligen Polymerase bzw. Expand-Puffer). Zusätzlich wurden jeweils 0,6 µM der entsprechenden Oligonukleotide und, falls nicht im PCR-Puffer enthalten, MgCl₂ in einer Endkonzentration von 1 bis 3 mM zugegeben. Folgende PCR -Programme fanden Verwendung:

Zur Amplifizierung von Kassetten zur homologen Rekombination

Castorp - Programm:	2min	94°C
	1min	94°C
10 Zyklen	50s	45°C
	1min 40s	68°C
	1min	94°C
20 Zyklen	50s	68°C
	1min 40s	68°C Extension +20s/ Zyklus
	4°C	∞

Zur Amplifizierung von Plasmid-DNA

MiS1 - Programm:	5min	94°C
10 Zyklen	30s	94°C
	30s	48°C
	45s	68°C
20 Zyklen	30s	94°C
	30s	58°C
	45s	68°C
	4°C	∞

Zur Hefe-Einzelzell-Kolonie-PCR

Yeastcol - Programm:	5min	94°C
30 Zyklen	30s	94°C
	30s	55°C
	1min	72°C
	5min	72°C
	4°C	∞

Alle PCR-Ansätze wurden anschließend durch Agarose-Gel-Elektrophorese überprüft.

4.4.4.2 PCR zur Sequenzierung von DNA

Zum Sequenzieren wurden 0,5 µg Plasmid-DNA, sowie 10 pmol Primer eingesetzt. Die Proben wurden nach Angaben des Herstellers mit dem Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham-Pharmacia) aufbereitet und die Sequenzierung in der AG Oesterheldt mit einem 377-Sequencer der Firma ABL durchgeführt.

4.4.4.3 PCR zur Mutagenese von DNA

Zum Setzen spezifische Mutationen, Deletion oder Insertionen amplifiziert man das zu mutierende Konstrukt mit Primern, welche in der entsprechenden DNA Sequenz die jeweilige Mutation bzw. Deletion oder Insertion tragen. Die PCR wird anschließend mit DpnI, welches das unmethylierte Ausgangsplasmid schneidet, bei 37°C verdaut und transformiert. Positive Kolonien wurden in Flüssigmedium angeimpft, das Plasmid isoliert und sequenziert.

4.4.3 Klonierung

4.4.3.1 Restriktionsverdau der DNA

Zum Verdau der DNA wurden Restriktionsendonukleasen aus Bakterien verwendet, welche sequenzspezifisch die Phosphodiesterbindungen beider Stränge der DNA hydrolytisch spalten. Diese wurden sowohl für analytische als auch für präparative Verdaue von Plasmid-DNA eingesetzt. Die eingesetzte Menge, Wahl der Puffer sowie die Temperaturbedingungen richteten sich nach den Angaben des Herstellers. Der Verdau wurde durch Zugabe von DNA-Auftragspuffer bzw. Hitzeinaktivierung gestoppt und die DNA mittels Agarosegel-Elektrophorese gereinigt.

4.4.3.2 Quantitative Dephosphorylierung von DNS-Fragmenten

Zur Vermeidung der Religation von geschnittenen Vektoren werden diese zur Dephosphorylierung der 5'-Enden mit Phosphatase behandelt. Dazu wurden pro 300 ng DNA mit 0,1 u Phosphatase (calf-intestine alkaline phosphatase von NEB) für 60 Minuten bei 37°C inkubiert.

4.4.3.3 Ligation

Zu Ligationszwecken setzt man in der Regel Insert zu Vektor immer in einem Verhältnis von 3:1 ein. Die Konzentrationen wurden vorher mittels Agarosegel-Elektrophorese abgeschätzt. Zu der DNA -Lösung wurde 1 µl T4-DNA-Ligase (NEB) und der entsprechende Ligasepuffer gegeben.

Ligiert wurde für 3 Stunden bei 16°C. Als Negativkontrolle wurde der geschnittene Vektor ohne Insert mitligiert. Anschließend wurde gegen H₂O durch eine Filtermembran (Millipore Filtrtype, 0,05 µm) dialysiert und je 0,5 bis 2 µl der Ligation in kompetente Bakterien transformiert.

4.5. Proteinbiochemische Methoden

4.5.1 Gel-Elektrophorese

4.5.1.1 SDS–Polyacrylamid-Gel Elektrophorese (SDS Page)

Durch SDS-PAGE ist die Auftrennung von Proteinen relativ zu ihrem Molekulargewicht in kDa möglich. Je nach Größe der aufzutrennenden Proteine wurde der Acrylamidgehalt des Trenngels zwischen 10 und 15 % variiert. Angaben für 5 Gele: 10-15 ml 30 % Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid; 12,5 ml 1,5 M Tris, ph 8,8; 250 µl 10 % SDS und 250 µl APS. Auf 30 ml mit H₂O aufgefüllt, 5 µl TEMED und in „mighty small“ Gelsysteme der Firma Hoefer gegossen. Nach Überschichten des Gels mit Isopropanol und Polymerisierung des Trenngels wurde der Isopropanol

entfernt und ein 4%-iges Sammelgel gegossen. Angaben für 1 Sammelgel: 1450 µl H₂O: 250 µl 30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid; 250 µl 1 M Tris, pH 6,8; 60 µl 10 % SDS: 60 µl APS und 5 µl TEMED.

Die Proteinproben wurden sowohl in 2x Laemmli-Puffer, als auch in HU-Puffer aufgenommen und durch Erhitzen 10 Minuten bei 95°C bzw. 65°C denaturiert. Nach Auftragen der Proben wurden diese bei 20 bis 25 mA aufgetrennt. Zum Abschätzen der Größe wurde darüber hinaus ein Größenmarker (peQ Gold Protein MarkerII) mit aufgetragen. Als Laufpuffer für die Elektrophorese diente folgende Lösung: 60 mM Tris pH 6,8 0,55 % Glycerin, 0,1 % SDS.

4.5.1.2 Bis-Tris-Gel-Elektrophorese

Zur feineren Auftrennung der Banden wurden alternativ auch Bis-Tris-Gele benutzt. Verwendung fanden sowohl 4-12%-ige Fertiggele (Invitrogen) als auch 8%-ige Gele. Angaben für zwei Gele: 8,2 ml H₂O: 3,8ml 30 % Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid; 2 ml 7x Bis-Tris/ HCl; 71 µl 10 % SDS: 142 µl APS und 11 µl TEMED. Die Gele wurden in *mighty small* Gelsysteme der Firma Hoefer gegossen und bei 100 bis 140 Volt in 1x MOPS-Laufpuffer benutzt.

4.5.1.3 Anfärben von Proteingelen

Zum Sichtbar machen der Proteine wurde das Gel 30 Minuten mit Comassie-Blau-Färbelösung (*stain*) gefärbt und anschließend 30 bis 90 Minuten mit Entfärber für Coomassiegele (*destain*) wieder entfärbt.

4.5.2 Western Blot

Um Proteine spezifisch nachweisen zu können, bedient man sich der Methode des Western Blottings. Beim Western Blot transferiert man die Proteine durch Anlegen einer elektrischen Spannung aus dem Gel auf eine geladene Membran, auf der die Proteine haften bleiben und immobilisiert werden und weißt diese anschließend mit Antikörpern nach. Der Sekundärantikörper ist im Allgemeinen an ein Enzym

gekoppelt, das bei Zugabe seines Substrats eine chemieluminiszierende Reaktion katalysiert, deren Intensität auf einem strahlungssensitiven Film detektiert wird.

Das jeweilige Polyacrylamid-Gel wurde auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran, welche vorher durch Befeuchtung mit Methanol aktiviert worden ist, gelegt und von jeder Seite mit zwei, in Western Blot Laufpuffer getränkten, *Whatman*-Filterpapieren umgeben. Diese Kombination wurde danach mit der Membranseite in Richtung des Pluspols in eine Tankblot-Apparatur (Hoefer) mit Western Blot-Transferpuffer eingespannt. Der eigentliche Blottingvorgang erfolgte dann bei 4°C und 70 V für 120 Minuten. Anschließend wurde die PVDF-Membran für 30 Minuten mit 5 % Magermilchpulver in TBST geblockt und für 1 Stunde oder über Nacht mit dem Primärantikörper in 5 % Magermilchpulver in TBST inkubiert. Nach 6 mal 5 minütigem Waschen mit TBST wurde, falls nötig, mit dem sekundären Antikörper (Verdünnung 1:5000) in 5 % Magermilchpulver in TBST für eine Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurde erneut 6 mal 5 Minuten mit TBST gewaschen und durch Zugabe von ECL (*enhanced chemie luminescence*; ECL-western Kit, Amersham) die Chemielumineszenz Reaktion nach Herstellerangaben eingeleitet. Die Detektion erfolgte mittels ECL-Hyperfilms (Amersham) und abschließender Entwicklung und Fixierung des Films in einer Entwicklermaschine (Amersham-Pharmacia).

4.5.3 Erstellen eines Proteinextraktes

4.5.3.1 Unter nativen Bedingungen

Aus einer Übernachtskultur wurde auf eine OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft und bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 1 Volumen Lysepuffer (mit 100 mM NaCl, inklusive NEM und Protease Inhibitor Tablette, Roche) aufgenommen. Zur Disruption wurde der Ansatz mit Glassperlen (Sigma 425-600µm) bis unter die Oberfläche versetzt und 4 mal 4 Minuten im Vortexschüttler geschüttelt. Um Proteolyse zu vermeiden, wurden die Zellen, zwischen den Schritten zum Abkühlen

4 Minuten auf Eis gestellt. Nach mikroskopischer Überprüfung der Lyse wurde der Zellaufschluss durch ein Loch im Boden des Reaktionsgefäßes (27 gauge Nadel) mittels Zentrifugation in ein anderes Eppendorfgefäß überführt. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Überstand mit Triton-X-100 (Endkonzentration 0,5 %) versetzt und für 15 Minuten auf den Taumelschüttler gegeben. Anschließend wurde 5 Minuten bei 5000rpm zentrifugiert und der Überstand weiterverwendet.

Für größere Zellkulturen von circa 40 Gramm wurde eine andere Methode zum Aufschließen der Zellen verwendet. Der Aufschluss der Zellen erfolgte hierbei durch drei Durchläufe in einer "french press", anschließendem Abzentrifugieren der Zelltrümmer (500g, 3 Minuten). Die Zugabe von Triton-X-100 und anschließenden Schritte verliefen wie oben erwähnt.

4.5.3.2 Unter denaturierenden Bedingungen

Einen Proteinextrakt unter denaturierenden Bedingungen stellt man unter anderen Bedingungen her, um postrtranslationale Modifikationen zu erhalten. Darüber hinaus vermeidet man auf diese Art und Weise auch die teilweise Proteolyse der Proteine.

1 ml einer logarithmischen Hefekultur mit einer OD_{600} von 1 wurden in 1 ml sterilem H_2O aufgenommen, mit 150 μ l einer frisch hergestellten 1,85 N NaOH/ 7,5 % β -Mercaptoethanol- Lösung versetzt und für 15 Minuten auf Eis transferiert. Nach Zugabe von 150 μ l 55 % Trichloressigsäure wurde weitere 10 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend zum Entfernen der TCA zweimal 10 Minuten in der Kühlzentrifuge bei 20.000g zentrifugiert und der Überstand jeweils gründlich abgenommen. Das Pellet wurde mit 50 μ l HU-Puffer versetzt und 10 Minuten bei 65°C denaturiert.

4.5.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in einer Lösung wurde mit dem "BioRad-

Proteinassay“ (Biorad Bradford assay) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden jeweils 1 bzw. 5 µl des Proteinextrakts zu 1 ml Bradford gegeben, gevortext und mit einem Eppendorf Photometer gemessen. Als Standard diente eine wässrige IgG-Lösung bekannter Konzentration.

4.5.4 Immunpräzipitation von Proteinen

Um Interaktionen *in vivo* nachweisen zu können wurden jeweils 100OD Hefezellen in HA-Puffer, inklusive NEM und protease Inhibitor Cocktail (Nasr et al.), aufgenommen mit Glassperlen (Sigma 425-600µm) versetzt und vier bis sechsmalig für je 30 Sekunden im Bead beater aufgeschlossen. Mittels Rucksackelution wurde das Lysat von den Glassperlen abgetrennt, für 15 Minuten mit 0,5% Triton-X-100 auf dem Rad durchmischt, abzentrifugiert und zu 14ul Antikörper gekoppelten beads gegeben (je nach Ansatz HA- oder Myc gekoppelte beads, Roche). Die Immunpräzipitation erfolgte über Nacht oder für drei Stunden bei 4°C. Anschließend wurde vier Mal mit 800ul HA-Puffer, inkl. 0,5% Triton-X-100, und zwei Mal mit HA-Puffer, inkl. 0,5% Triton-X-100 und 300mM NaCl gewaschen, der Überstand abgesaugt und die beads in 20uL HU-Puffer aufgenommen und bei 65°C für 10 Minuten erhitzt. Die Darstellung der Kolimmunpräzipitation erfolgte mittels Western Blotting.

4.5.6 Denaturierende Ni-NTA-Chromatographie von Hefeproteinen

Diese Methode wurde im Rahmen der Arbeit zum Nachweis der SUMOylierung bzw. Ubiquitylierung von Proteinen, durch Überexpression von HIS-SUMO bzw. HIS-Ubiquitin eingesetzt.

Dazu wurden 200 OD Hefezellen mit 5 ml 2 N NaOH/ 7,5 % β-Mercaptoethanol versetzt, gevortext und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 5 ml 55 %-iger TCA, Inkubation auf Eis für 15 Minuten und Pelletieren der Proteine (15 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit) wurde zweimal mit eiskaltem Aceton

gewaschen. Das Pellet wurde durch gründliches Auf- und Abpipettieren in 2 Volumen Puffer A mit 0,05 % Tween 20 resuspendiert und für eine Stunde auf einem Taumelschüttler bei RT solubilisiert. Anschließend wurden unlösliche Proteine für 20 Minuten bei 20.000 g in einer Kühlzentrifuge abzentrifugiert, der klare Überstand mit Imidazol auf eine Endkonzentration von 20 mM gebracht und 50 µl NiNTA Perlen (Qiagen) zugegeben. Diese Lösung wurde über Nacht im Taumelschüttler bei 4°C inkubiert. Die Perlen wurden mit einem Magneten (MPC, Dynal) pelletiert, in ein Eppendorfgefäß überführt und dreimal mit Puffer A mit 0,05 % Tween 20 und 20 mM Imidazol sowie fünfmal mit Puffer C mit 0,05 % Tween 20 gewaschen. Nach erneutem Transfer in ein frisches Eppendorfgefäß und Absaugen des Überstandes wurde mit 30 µl 1 % SDS 10 Minuten bei 65°C eluiert. Nach Trocknung im Vakuum wurde das Pellet in 10 µl H₂O sowie 15 µl HU-Puffer aufgenommen.

4.5.7 Native Aufreinigung von SUMOylierten Proteinen

Eine weitere Methode, um SUMOylierte Proteinen aufzureinigen, war die Isolierung von SUMO-Substraten durch Bindung an eine, mit dem SUMO-interagierendem Motiv von FIR1, gekoppelte GST-Säule.

Hierzu wurde das native Zelllysate von je 100OD für 3 Stunden zu je 20 µl FIR^{SIM}-GST bzw. GST-gekoppelter Glutathion-Sepharose gegeben und bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Die weitere Aufreinigung und Detektion erfolgte wie bereits für die Immunpräzipitation geschildert.

4.5.8 Tandem-Massenspektroskopie

Im Rahmen der Doktorarbeit wurden Proteine, die mit einer Wss1^{3HA} Affinitätsaufreinigung isoliert werden konnten, über Tandem-Massenspektrometrie, auch MS/MS-Technik genannt, bestimmt. Durch die zusätzliche Verwendung eines zweiten Massenspektrometers kann dabei neben der Masse gleichzeitig auch die Sequenz des Proteins bestimmt werden, wodurch die Signifikanz der Analyse erhöht

wird. Zunächst wurde jedoch ein "Im Gel Verdau" durchgeführt, bevor die Peptide massenspektrometrisch untersucht werden konnten.

Dafür wurde die zu untersuchende Bande mit einem sterilen Skalpell aus einem Fertiggel ausgeschnitten, in ca. 1x1 mm große Würfel zerschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Gelstückchen wurden mit je 100 µl 50 mM Ammoniumbicarbonat (NH_4HCO_3) sowie Acetonitril (AcN) für je zehn Minuten gewaschen. Der Vorgang wurde wiederholt und restliches Acetonitril durch Vakuumzentrifugation entfernt. Anschließend wurde der Ansatz in 10 µl 10 mM Dithiotreitol (DTT)/ 50 mM Ammoniumbicarbonat aufgenommen und für 45 Minuten bei 56°C inkubiert. Danach wurde die überschüssige Flüssigkeit bei RT entfernt, mit 100 µl frisch angesetzttem Iodoacetamid, in 50 mM Ammoniumbicarbonat, für 10 Minuten ersetzt, und für 30 Minuten bei RT und Dunkelheit inkubiert. Nach Entfernung der Iodoacetamid-Lösung wurde mit je 100 µl 50 mM Ammoniumbicarbonat sowie Acetonitril für je zehn Minuten gewaschen und wiederum restliches Acetonitril durch Vakuumzentrifugation entfernt. Falls bis zu diesem Zeitpunkt die Coomassiefärbung nicht vollkommen entfernt werden konnte, wurden zusätzliche Waschschrte vorgenommen. Die Gelpartikel wurden anschließend mit je nach Volumen 5-10 µl Trypsin, (12,5 ng/ µl; Promega) in 50 mM Ammoniumbicarbonat, inkubiert. Nach vollständiger Absorbtion der Flüssigkeit, wurden 50 mM Ammoniumbicarbonat zugegeben und für ungefähr 15 Stunden bei 37°C inkubiert. Zur Extraktion der Peptide wurden die Gelpartikel für 1 Stunde mit 20 µl 5% Formamid gewaschen, mit 20 µl Acetonitril dehydriert, durch Vakuumzentrifugation getrocknet und in 5% Formamid oder 0,1 % Trifluoessigsäure (TFA) gelöst. Die Tandem-Massenspektrometrie wurde anschließend mit einem Bruker Reflex 3-Massenspektrometer durchgeführt.

4.5.9 Protease-Aktivitätsnachweis

4.5.9.1 Autoprozessierung

Zur Darstellung der autoproteolytischen Aktivität von Wss1 wurde jeweils 12 µg Wss1 protein für 3 Stunden auf 30°C in 100mM NaCl, Tris pH 7,5 inkubiert, anschließend in 1x Laemmli puffer aufgenommen, per SDS Elektrophorese aufgetrennt und zur Darstellung Coomassie gefärbt.

4.5.9.2 Prozessierung *in trans*

Hierfür wurde die proteolytisch inactive 3myc getaggte Wss1 Variante H115A aus Hefezellen mit Mycbeads (Nasr et al.) aufgereinigt, extensive mit 700mM NaCl und 0.5% Triton-X-100 gewaschen und für 3h bei 30°C mit rekombinantem Wss1 in 100mM NaCl, Tris pH 7,5 inkubiert. Je nach Ansatz wurde von 30 Minuten bis zu 3 Stunden inkubiert. Die myc beads wurden anschließend gewaschen und in 20µl HU Puffer aufgenommen. Die *in trans* Prozessierung wurde mittels Western Blot dargestellt.

4.5.9.3 Prozessierung von Top1

Die Top1 Prozessierung wurde analog der *in trans* Prozessierung durchgeführt. Das getaggte Top1-Protein wurde mit spezifischen *beads* aufgreinigt, extensiv gewaschen und mit rekombinantem Wss1 inkubiert. Je nach Ansatz wurde für 30Minuten bzw. bis zu 3 Stunden inkubiert, danach die *beads* gewaschen und in 20µl HU Puffer aufgenommen.

4.5.10 *In vitro* Interaktion von rekombinanten Proteinen

Um Festzustellen, ob Wss1 und Cdc48 direkt miteinander interagieren können wurde deren Interaktion mit aufgereinigten Proteinen untersucht. Dazu wurde GST-

Cdc48 bzw. trunkierte Versionen von Cdc48, N- bzw. D1D2 domäne, oder GST als Negativkontrolle, in equimolaren Mengen für je eine Stunde an GST beads (Amersham) gebunden. Anschließend wurde einmal mit PBS +0,5% Tritin-X-100 gewaschen, rekombinantes Wss1 in äquimolarer Menge zugegeben und für zwei bis drei Stunden inkubiert. Die *beads* wurden sechs mal mit PBS+0,5% Tritin-X-100 waschen und in 20µl Laemmli Puffer aufgenommen. Die Bindung wurde mittels SDS-Gelelektrophorese und Coomassie Färbung überprüft.

4.6. Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligodesoxynukleotide (PCR-Primer) wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) hergestellt. Lyophilisierte Primer wurden in Wasser auf eine Konzentration von 100 pmol/ µl eingestellt. Diese Stammlösung wurde in Aliquots mit PCR-Primerpaaren in für die PCR-Amplifikation einsetzbarer Konzentration (je 10 pmol/ µl) verdünnt. Sowohl die Stammlösung als auch die Aliquots wurden bei -20°C aufbewahrt.

4.7. Abkürzungsverzeichnis

aa/As	Aminosäuren
AD-	Aktivierungsdomäne des Gal4 Transkriptionsfaktors
Ala/ A	Alanin
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AT	3-Amino-1,2,4-triazol (Aminotriazol)
BD-	DNA-Bindedomäne des Gal4 Transkriptionsfaktors
bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
CHL	Chloramphenicol
CIAP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase
DMF	<i>N,N</i> -Dimethyl-Formamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERAD	ER-assozierte Degradation
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>

Gly	Glycin
GST	Glutathion-S-Transferase
HCl	Hydroxy-Chlorid
His/H	Histidin
HU	<i>High urea</i>
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Broth
Leu/L	Leucin
LiAc	Lithium Acetat
Lys	Lysin
mA	Milliampere
Mat	<i>mating type</i> / Konjugationstyp
mg	Milligramm
ml	Milliliter
min	Minuten
MOPS	3-(N-Morpholino) propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS/ MS	Tandemmassenspektroskopie
Mut	Mutante
NAT	Nourseothricin
NEM	2 M N-ethylmaleimide

NiNTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NMR	Kernmagnetische Resonanz
NTP	Nucleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> / offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
Pd	Protease-defizient
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Polymethylsulfonylfluorid
Poly-A	Polyadenyl
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces</i>
Sc- Ade	Minimalmedium, dem Adenin fehlt
Sc- Leu	Minimalmedium, dem Leucin fehlt
Sc- His	Minimalmedium, dem Histidin fehlt
Sc- Ura	Minimalmedium, dem Uracil fehlt
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sec/ s	Sekunden
SL	Synthetisch letal
TBE	Tris-Borat-EDTA

TBS	Tris Buffered Saline
TBST	Tris Buffered Saline/Tween
Temed	Tetramethylenethyldiamin
Tet	Tetracyclin
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp/W	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
U	Unit
UAS	<i>upstream activating sequence</i>
Ura	Uracil
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen/ Volumen
w/v	<i>weight / volume</i>
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid
Y2H	Hefe-Zwei-Hybrid

5. Literaturverzeichnis

Alvaro, D., Lisby, M., and Rothstein, R. (2007). Genome-wide analysis of Rad52 foci reveals diverse mechanisms impacting recombination. *PLoS Genet* 3, e228.

Bachmair, A., Finley, D., and Varshavsky, A. (1986). In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* 234, 179-186.

Beuron, F., Dreveny, I., Yuan, X., Pye, V.E., McKeown, C., Briggs, L.C., Cliff, M.J., Kaneko, Y., Wallis, R., Isaacson, R.L., *et al.* (2006). Conformational changes in the AAA ATPase p97-p47 adaptor complex. *EMBO J* 25, 1967-1976.

Biggins, S., Bhalla, N., Chang, A., Smith, D.L., und Murray, A.W. (2001). Genes involved in sister chromatid separation and segregation in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 159, 453-470.

Birrell, G.W., Giaever, G., Chu, A.M., Davis, R.W., und Brown, J.M. (2001). A genome-wide screen in *Saccharomyces cerevisiae* for genes affecting UV radiation sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12608-12613.

Braun, S., Matuschewski, K., Rape, M., Thoms, S., und Jentsch, S. (2002). Role of the ubiquitin-selective CDC48(UFD1/NPL4)chaperone (segregase) in ERAD of OLE1 and other substrates. *EMBO J* 21, 615-621.

Buchberger, A., Howard, M.J., Proctor, M., und Bycroft, M. (2001). The UBX domain: a widespread ubiquitin-like module. *J Mol Biol* 307, 17-24.

Bylebyl, G.R., Belichenko, I., und Johnson, E.S. (2003). The SUMO isopeptidase Ulp2 prevents accumulation of SUMO chains in yeast. *J Biol Chem* 278, 44113-44120.

Chen, X.L., Silver, H.R., Xiong, L., Belichenko, I., Adegite, C., und Johnson, E.S. (2007). Topoisomerase I-dependent viability loss in *saccharomyces cerevisiae* mutants defective in both SUMO conjugation and DNA repair. *Genetics* 177, 17-30.

Cheng, Y.L., and Chen, R.H. The AAA-ATPase Cdc48 and cofactor Shp1 promote chromosome bi-orientation by balancing Aurora B activity. *J Cell Sci*.

D'Amours, D., und Jackson, S.P. (2002). The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 317-327.

Davies, D.R., Interthal, H., Champoux, J.J., und Hol, W.G. (2003). Crystal structure of a transition state mimic for Tdp1 assembled from vanadate, DNA, and a topoisomerase I-derived peptide. *Chem Biol* 10, 139-147.

Debethune, L., Kohlhagen, G., Grandas, A., und Pommier, Y. (2002). Processing of nucleopeptides mimicking the topoisomerase I-DNA covalent complex by tyrosyl-DNA phosphodiesterase. *Nucleic Acids Res* 30, 1198-1204.

Deng, C., Brown, J.A., You, D., und Brown, J.M. (2005). Multiple endonucleases function to repair covalent topoisomerase I complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 170, 591-600.

Deveraux, Q., Ustrell, V., Pickart, C., und Rechsteiner, M. (1994). A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J Biol Chem* 269, 7059-7061.

Elkabetz, Y., Shapira, I., Rabinovich, E., und Bar-Nun, S. (2004). Distinct steps in dislocation of luminal endoplasmic reticulum-associated degradation substrates: roles of endoplasmic reticulum-bound p97/Cdc48p and proteasome. *J Biol Chem* 279, 3980-3989.

Finley, D., Ozkaynak, E., und Varshavsky, A. (1987). The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses. *Cell* 48, 1035-1046.

Frohlich, K.U., Fries, H.W., Rudiger, M., Erdmann, R., Botstein, D., und Mecke, D. (1991). Yeast cell cycle protein CDC48p shows full-length homology to the mammalian protein VCP and is a member of a protein family involved in secretion, peroxisome formation, and gene expression. *J Cell Biol* 114, 443-453.

Ghislain, M., Dohmen, R.J., Levy, F., und Varshavsky, A. (1996). Cdc48p interacts with Ufd3p, a WD repeat protein required for ubiquitin-mediated proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 15, 4884-4899.

Girdwood, D., Bumpass, D., Vaughan, O.A., Thain, A., Anderson, L.A., Snowden, A.W., Garcia-Wilson, E., Perkins, N.D., und Hay, R.T. (2003). P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Mol Cell* 11, 1043-1054.

Groll, M., Bajorek, M., Kohler, A., Moroder, L., Rubin, D.M., Huber, R., Glickman, M.H., und Finley, D. (2000). A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol* 7, 1062-1067.

Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D., und Huber, R. (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 386, 463-471.

Hay, R.T. (2005). SUMO: a history of modification. *Mol Cell* 18, 1-12.

Hecker, C.M., Rabiller, M., Haglund, K., Bayer, P., und Dikic, I. (2006). Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. *J Biol Chem* 281, 16117-16127.

Hibbert, R.G., Mattioli, F., und Sixma, T.K. (2009). Structural aspects of multi-domain RING/Ubox E3 ligases in DNA repair. *DNA Repair (Amst)* 8, 525-535.

Hicke, L., und Dunn, R. (2003). Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 141-172.

Hitt, R., und Wolf, D.H. (2004). Der1p, a protein required for degradation of malformed soluble proteins of the endoplasmic reticulum: topology and Der1-like proteins. *FEMS Yeast Res* 4, 721-729.

Hoegge, C., Pfander, B., Moldovan, G.L., Pyrowolakis, G., und Jentsch, S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419, 135-141.

Hoppe, T., Matuschewski, K., Rape, M., Schlenker, S., Ulrich, H.D., und Jentsch, S. (2000). Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing. *Cell* 102, 577-586.

Horie, K., Tomida, A., Sugimoto, Y., Yasugi, T., Yoshikawa, H., Taketani, Y., und Tsuruo, T. (2002). SUMO-1 conjugation to intact DNA topoisomerase I amplifies cleavable complex formation induced by camptothecin. *Oncogene* 21, 7913-7922.

Inamdar, K.V., Pouliot, J.J., Zhou, T., Lees-Miller, S.P., Rasouli-Nia, A., und Povirk, L.F. (2002). Conversion of phosphoglycolate to phosphate termini on 3' overhangs of DNA double strand breaks by the human tyrosyl-DNA phosphodiesterase hTdp1. *J Biol Chem* 277, 27162-27168.

Interthal, H., Pouliot, J.J., und Champoux, J.J. (2001). The tyrosyl-DNA phosphodiesterase Tdp1 is a member of the phospholipase D superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12009-12014.

Iyer, L.M., Koonin, E.V., und Aravind, L. (2004). Novel predicted peptidases with a potential role in the ubiquitin signaling pathway. *Cell Cycle* 3, 1440-1450.

Jacquiau, H.R., van Waardenburg, R.C., Reid, R.J., Woo, M.H., Guo, H., Johnson, E.S., und Bjornsti, M.A. (2005). Defects in SUMO (small ubiquitin-related modifier) conjugation and deconjugation alter cell sensitivity to DNA topoisomerase I-induced DNA damage. *J Biol Chem* 280, 23566-23575.

Jarosch, E., Taxis, C., Volkwein, C., Bordallo, J., Finley, D., Wolf, D.H., und Sommer, T. (2002). Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48. *Nat Cell Biol* 4, 134-139.

Jentsch, S., Seufert, W., Sommer, T., und Reins, H.A. (1990). Ubiquitin-conjugating enzymes: novel regulators of eukaryotic cells. *Trends Biochem Sci* 15, 195-198.

Johnson, E.S., Ma, P.C., Ota, I.M., und Varshavsky, A. (1995). A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J Biol Chem* 270, 17442-17456.

Katou, Y., Kanoh, Y., Bando, M., Noguchi, H., Tanaka, H., Ashikari, T., Sugimoto, K., und Shirahige, K. (2003). S-phase checkpoint proteins Tof1 and Mrc1 form a stable replication-pausing complex. *Nature* 424, 1078-1083.

Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H.D., Mayer, T.U., und Jentsch, S. (1999). A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 96, 635-644.

Kosoy, A., Calonge, T.M., Outwin, E.A., und O'Connell, M.J. (2007). Fission yeast Rnf4 homologs are required for DNA repair. *J Biol Chem* 282, 20388-20394.

Kroetz, M.B., Su, D., und Hochstrasser, M. (2009). Essential role of nuclear localization for yeast Ulp2 SUMO protease function. *Mol Biol Cell* 20, 2196-2206.

Krogh, B.O., und Symington, L.S. (2004). Recombination proteins in yeast. *Annu Rev Genet* 38, 233-271.

Lallemand-Breitenbach, V., Jeanne, M., Benhenda, S., Nasr, R., Lei, M., Peres, L., Zhou, J., Zhu, J., Raught, B., und de The, H. (2008). Arsenic degrades PML or PML-RARalpha through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway. *Nat Cell Biol* 10, 547-555.

Li, S.J., und Hochstrasser, M. (2000). The yeast ULP2 (SMT4) gene encodes a novel protease specific for the ubiquitin-like Smt3 protein. *Mol Cell Biol* 20, 2367-2377.

Li, S.J., und Hochstrasser, M. (2003). The Ulp1 SUMO isopeptidase: distinct domains required for viability, nuclear envelope localization, and substrate specificity. *J Cell Biol* 160, 1069-1081.

Licht, S., und Lee, I. (2008). Resolving individual steps in the operation of ATP-dependent proteolytic molecular machines: from conformational changes to substrate translocation and processivity. *Biochemistry* 47, 3595-3605.

Liu, C., Pouliot, J.J., und Nash, H.A. (2002). Repair of topoisomerase I covalent complexes in the absence of the tyrosyl-DNA phosphodiesterase Tdp1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14970-14975.

Mohan, R.D., Rao, A., Gagliardi, J., und Tini, M. (2007). SUMO-1-dependent allosteric regulation of thymine DNA glycosylase alters subnuclear localization and CBP/p300 recruitment. *Mol Cell Biol* 27, 229-243.

Moir, D., Stewart, S.E., Osmond, B.C., und Botstein, D. (1982). Cold-sensitive cell-division-cycle mutants of yeast: isolation, properties, and pseudoreversion studies. *Genetics* 100, 547-563.

Mullen, J.R., und Brill, S.J. (2008). Activation of the Slx5-Slx8 ubiquitin ligase by poly-small ubiquitin-like modifier conjugates. *J Biol Chem* 283, 19912-19921.

Mullen, J.R., Kaliraman, V., Ibrahim, S.S., und Brill, S.J. (2001). Requirement for three novel protein complexes in the absence of the Sgs1 DNA helicase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 157, 103-118.

Nasr, R., Guillemain, M.C., Ferhi, O., Soilihi, H., Peres, L., Berthier, C., Rousselot, P., Robledo-Sarmiento, M., Lallemand-Breitenbach, V., Gourmel, B., *et al.* (2008). Eradication of acute promyelocytic leukemia-initiating cells through PML-RARA degradation. *Nat Med* 14, 1333-1342.

Nijman, S.M., Luna-Vargas, M.P., Velds, A., Brummelkamp, T.R., Dirac, A.M., Sixma, T.K., und Bernards, R. (2005). A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* 123, 773-786.

Nitiss, K.C., Malik, M., He, X., White, S.W., und Nitiss, J.L. (2006). Tyrosyl-DNA phosphodiesterase (Tdp1) participates in the repair of Top2-mediated DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8953-8958.

O'Neill, B.M., Hanway, D., Winzeler, E.A., und Romesberg, F.E. (2004). Coordinated functions of WSS1, PSY2 and TOF1 in the DNA damage response. *Nucleic Acids Res* 32, 6519-6530.

Palladino, F., und Klein, H.L. (1992). Analysis of mitotic and meiotic defects in *Saccharomyces cerevisiae* SRS2 DNA helicase mutants. *Genetics* 132, 23-37.

Percherancier, Y., Germain-Desprez, D., Galisson, F., Mascle, X.H., Dianoux, L., Estephan, P., Chelbi-Alix, M.K., und Aubry, M. (2009). Role of SUMO in RNF4-mediated promyelocytic leukemia protein (PML) degradation: sumoylation of PML and phospho-switch control of its SUMO binding domain dissected in living cells. *J Biol Chem* 284, 16595-16608.

Perry, J.J., Tainer, J.A., and Boddy, M.N. (2008). A simultaneous role for SUMO and ubiquitin. *Trends Biochem Sci* 33, 201-208.

Pfander, B., Moldovan, G.L., Sacher, M., Hoege, C., und Jentsch, S. (2005). SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase. *Nature* 436, 428-433.

Pickart, C.M., und Eddins, M.J. (2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1695, 55-72.

Piwko, W., und Jentsch, S. (2006). Proteasome-mediated protein processing by bidirectional degradation initiated from an internal site. *Nat Struct Mol Biol* 13, 691-697.

Pommier, Y., Redon, C., Rao, V.A., Seiler, J.A., Sordet, O., Takemura, H., Antony, S., Meng, L., Liao, Z., Kohlhagen, G., *et al.* (2003). Repair of and checkpoint response to topoisomerase I-mediated DNA damage. *Mutat Res* 532, 173-203.

Pouliot, J.J., Yao, K.C., Robertson, C.A., und Nash, H.A. (1999). Yeast gene for a Tyr-DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase I complexes. *Science* 286, 552-555.

Prudden, J., Pebernard, S., Raffa, G., Slavin, D.A., Perry, J.J., Tainer, J.A., McGowan, C.H., und Boddy, M.N. (2007). SUMO-targeted ubiquitin ligases in genome stability. *EMBO J* 26, 4089-4101.

Rape, M., Hoppe, T., Gorr, I., Kalocay, M., Richly, H., und Jentsch, S. (2001). Mobilization of processed, membrane-tethered SPT23 transcription factor by CDC48(UFD1/NPL4), a ubiquitin-selective chaperone. *Cell* 107, 667-677.

Richly, H., Rape, M., Braun, S., Rumpf, S., Hoege, C., und Jentsch, S. (2005). A series of ubiquitin binding factors connects CDC48/p97 to substrate multiubiquitylation and proteasomal targeting. *Cell* 120, 73-84.

Rumpf, S., und Jentsch, S. (2006). Functional division of substrate processing cofactors of the ubiquitin-selective Cdc48 chaperone. *Mol Cell* 21, 261-269.

Sacher, M., Pfander, B., Hoege, C., und Jentsch, S. (2006). Control of Rad52 recombination activity by double-strand break-induced SUMO modification. *Nat Cell Biol* 8, 1284-1290.

Sato, B.K., und Hampton, R.Y. (2006). Yeast Derlin Dfm1 interacts with Cdc48 and functions in ER homeostasis. *Yeast* 23, 1053-1064.

Schrader, E.K., Harstad, K.G., und Matouschek, A. (2009). Targeting proteins for degradation. *Nat Chem Biol* 5, 815-822.

Schuberth, C., und Buchberger, A. (2008). UBX domain proteins: major regulators of the AAA ATPase Cdc48/p97. *Cell Mol Life Sci* 65, 2360-2371.

Schuberth, C., Richly, H., Rumpf, S., und Buchberger, A. (2004). Shp1 and Ubx2 are adaptors of Cdc48 involved in ubiquitin-dependent protein degradation. *EMBO Rep* 5, 818-824.

Sheng, Y., Saridakis, V., Sarkari, F., Duan, S., Wu, T., Arrowsmith, C.H., und Frappier, L. (2006). Molecular recognition of p53 and MDM2 by USP7/HAUSP. *Nat Struct Mol Biol* 13, 285-291.

Song, J., Durrin, L.K., Wilkinson, T.A., Krontiris, T.G., und Chen, Y. (2004). Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14373-14378.

Tatham, M.H., Geoffroy, M.C., Shen, L., Plechanovova, A., Hattersley, N., Jaffray, E.G., Palvimo, J.J., und Hay, R.T. (2008). RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation. *Nat Cell Biol* 10, 538-546.

Tong, A.H., Evangelista, M., Parsons, A.B., Xu, H., Bader, G.D., Page, N., Robinson, M., Raghibizadeh, S., Hogue, C.W., Bussey, H., *et al.* (2001). Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science* 294, 2364-2368.

Tong, A.H., Lesage, G., Bader, G.D., Ding, H., Xu, H., Xin, X., Young, J., Berriz, G.F., Brost, R.L., Chang, M., *et al.* (2004). Global mapping of the yeast genetic interaction network. *Science* 303, 808-813.

Uzunova, K., Gottsche, K., Miteva, M., Weisshaar, S.R., Glanemann, C., Schnellhardt, M., Niessen, M., Scheel, H., Hofmann, K., Johnson, E.S., *et al.* (2007). Ubiquitin-dependent proteolytic control of SUMO conjugates. *J Biol Chem* 282, 34167-34175.

Vance, J.R., und Wilson, T.E. (2002). Yeast Tdp1 and Rad1-Rad10 function as redundant pathways for repairing Top1 replicative damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13669-13674.

van Hagen, M., Overmeer, R.M., Abolvardi, S.S., and Vertegaal, A.C. RNF4 and VHL regulate the proteasomal degradation of SUMO-conjugated Hypoxia-Inducible Factor-2alpha. *Nucleic Acids Res* 38, 1922-1931.

Verma, R., Oania, R., Graumann, J., und Deshaies, R.J. (2004). Multiubiquitin chain receptors define a layer of substrate selectivity in the ubiquitin-proteasome system. *Cell* 118, 99-110.

Walz, J., Erdmann, A., Kania, M., Typke, D., Koster, A.J., und Baumeister, W. (1998). 26S proteasome structure revealed by three-dimensional electron microscopy. *J Struct Biol* 121, 19-29.

Wang, Z., und Prelich, G. (2009). Quality control of a transcriptional regulator by SUMO-targeted degradation. *Mol Cell Biol* 29, 1694-1706.

Wilkinson, K.A., und Henley, J.M. Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *Biochem J* 428, 133-145.

Xie, Y., Kerscher, O., Kroetz, M.B., McConchie, H.F., Sung, P., und Hochstrasser, M. (2007). The yeast Hex3.Slx8 heterodimer is a ubiquitin ligase stimulated by substrate sumoylation. *J Biol Chem* 282, 34176-34184.

Xie, Y., Rubenstein, E.M., Matt, T., und Hochstrasser, M. SUMO-independent in vivo activity of a SUMO-targeted ubiquitin ligase toward a short-lived transcription factor. *Genes Dev.*

Xu, P., Duong, D.M., Seyfried, N.T., Cheng, D., Xie, Y., Robert, J., Rush, J., Hochstrasser, M., Finley, D., und Peng, J. (2009). Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell* 137, 133-145.

Yang, S.W., Burgin, A.B., Jr., Huizenga, B.N., Robertson, C.A., Yao, K.C., und Nash, H.A. (1996). A eukaryotic enzyme that can disjoin dead-end covalent complexes between DNA and type I topoisomerases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11534-11539.

Ye, Y., Meyer, H.H., und Rapoport, T.A. (2003). Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains. *J Cell Biol* 162, 71-84.

Young, P., Deveraux, Q., Beal, R.E., Pickart, C.M., und Rechsteiner, M. (1998). Characterization of two polyubiquitin binding sites in the 26 S protease subunit 5a. *J Biol Chem* 273, 5461-5467.

Zhang, X., Shaw, A., Bates, P.A., Newman, R.H., Gowen, B., Orlova, E., Gorman, M.A., Kondo, H., Dokurno, P., Lally, J., *et al.* (2000). Structure of the AAA ATPase p97. *Mol Cell* 6, 1473-1484.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Stefan Jentsch für seinen Enthusiasmus und seine Hilfsbereitschaft bedanken. Besonders dankbar bin ich für seine permanente Unterstützung und die große Freiheit, die er mir beim Bearbeiten meines Themas gelassen hat.

Bei Prof. Charles David bedanke ich mich recht herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens, sowie bei Prof. Angelika Böttger und Prof. Thomas Cremer für die Teilnahme an meiner mündlichen Prüfung.

Darüber hinaus gilt mein Dank allen anderen Mitgliedern der Abteilung Jentsch. Die einmalige Arbeitsatmosphäre und die gelegentlichen Zusammenkünfte außerhalb des Labors haben das Arbeiten hier extrem angenehm gestaltet. Besonderer Dank geht dabei an Kenji für unsere "Balkon"-Diskussionsrunden und dafür, dass er mir auch außerhalb des Labors ein wichtiger Freund geworden ist. Vielen Dank auch den Leuten aus dem "SUMO-Labor" wie Steven, Natalie, Boris, Meik, Lucian, Kathrin und Ulla. Eure Diskussionsfreude und das überaus gute Arbeitsklima haben den Laboralltag für mich extrem bereichert. Bei Natalie und Kenji möchte ich noch für das Korrekturlesen der Arbeit bedanken.

Ganz besonderer Dank geht an meine Familie und Anjuscha für ihre Unterstützung und ihr Verständnis. Eure Geduld und eure permanente Unterstützung haben ganz entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Michael Schwarz
Adresse	Kazmairstrasse 42 80339 München 089/54036836
Geburtsdatum	14.06.1977
Geburtsort	München

Schulbildung

1984-1988	Kafka-Grundschule/ München
1988-1995	Werner-von-Siemens- Gymnasium/ München
1995-1997	Heinrich-Heine-Gymnasium/ München

Zivildienst

1997-1998	Die Johanniter, Krankenhaus Neuperlach
-----------	--

Studium

1998-2004	Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität, München Diplomarbeit über "Charakterisierung von SUMO- bindenden Proteinen" (Prof. Stefan Jentsch) Abschluß mit Diplom im April 2004
-----------	--

Doktorarbeit

2004-2010	Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsries/ München Abteilung Molekulare Zellbiologie (Prof. Stefan Jentsch)
-----------	---